ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 2

LA FURONCULOSE DES SALMONIDES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE PATHOGENE D'UNE EXOTOXINE

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982

par

Dominique, Marie-Joseph, Jean GALLET DE SAINT-AURIN

Né le 1er Janvier 1954 à FORT DE FRANCE (Martinique)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur ECALLE
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs : ..... Monsieur DORCHIES
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur CHANTAL
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

UNIV.
LEIDEN
MED.

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE : 1982 THESE : 2

LA FURONCULOSE DES SALMONIDES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE PATHOGENE D'UNE EXOTOXINE

THESE

Pour le Doctorat Vétérinaire
(Diplôme d'Etat)
Présentée et soutenue publiquement en 1982

par

Dominique, Marie-Joseph, Jean GALLET DE SAINT-AURIN

Né le 1er Janvier 1954 à FORT DE FRANCE (Martinique)

Membres du Jury

Président : ..... Monsieur ECALLE
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Assesseurs ..... Monsieur DORCHIES
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Monsieur CHANTAL
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : ..... M.LAUTIE
Directeur honoraire : ..... M. FLORIO
Professeurs honoraires : ..... M. BRIZARD
..... M. SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZE

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... M. RICO
Professeur sans chaire ..... M. BRAUN
Maître Assistant ..... M. BENARD

Physique Biologique et Médicale
Chimie Biologique et Médicale
Informatique biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... M. PAVAUX
Maître Assistant ..... M. LIGNEREUX
Maître Assistant ..... M. SAUTET

Organogénèse - Tératologie
Anatomie Générale - Anatomie Appliquée

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE, PHARMACODYNAMIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... M. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... M. FARGEAS
Maître Assistant Agrégé ..... M. TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie - Thérapeutique

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire ..... M. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire ..... M. CABANIE
Maître Assistant Agrégé ..... M. MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique - Clinique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire ..... M. LABIE
Maître de Conférences ..... M. EECKHOUTTE
Maître Assistant Agrégé ..... Mme BENARD

Hygiène - Inspection - Contrôle et Technologie des denrées alimentaires d'origine animale - Clinique

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire ..... M. DORCHIES
Maître de Conférences ..... M. FRANC
Maître Assistant ..... M. DUCOS DE LAHITTE

Zoologie appliquée - Ecologie - Parasitologie externe -
Dermatologie - Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE
DES EQUIDES ET CARNIVORES ET DE LEGISLATION

Professeur titulaire ..... M. LESCURE
Maître de Conférences ..... M. GUELFI
Maître Assistant ..... M. REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL
ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire ..... M. TOURNUT
Maître de Conférences ..... M. BEZILLE
Maître Assistant ..... M. JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du bétail et des animaux de basse-cour
Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire ..... M. CAZIEUX
Maître de Conférences ..... M. GENEVOIS
Maître-Assistant ..... M. AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale - Radiologie - Technique Chirurgicale - Anesthésiologie
Pathologie Chirurgicale - Clinique - Traumatologie - Podologie orthopédique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire ..... M. FERNEY
Professeur sans chaire ..... M. ROYAL

Pathologie de l'appareil génital et de la mamelle - Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction - Obstétrique et pathologie du nouveau-né - Clinique - Consultation itinérante

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES -
LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire ..... M. CHANTAL
Maître Assistant ..... M. PICAVET

Epidémiologie - Maladies contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. LAUTIE
Maître Assistant ..... M. PELLERIN

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

CHAIRE D'ELEVAGE ET ECONOMIE

Professeur titulaire ..... M. QUEINNEC
Professeur sans chaire ..... M. DARRE
Maître Assistant ..... Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique animale - Extérieur - Zootechnie et Economie générales - Ethologie appliquée, Sciences, Techniques, Economie de l'Elevage et des Productionsanimales
Insémination artificielle - Organisation de l'Elevage

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire ..... M. FALIU
Professeur sans chaire ..... M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs : ANGELIER. ARMENGAUD. COMBES. COMBRET. CROS. FERNET. et MAZENC.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsable des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 juin 1924).

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur ECALLE

de l'Université Paul Sabatier de Toulouse

Qui a bien voulu accepter de
présider notre Jury de Thèse
Hommages respectueux

A NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur DORCHIES
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

En remerciement de son accueil compréhensif et des conseils qu'il nous a prodigués.

Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect

Monsieur le Professeur CHANTAL
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Avec nos remerciements.

Au Docteur A.L.S. MUNRO

de la section d'Ichtyopathologie du Laboratoire Maritime du "Department of Agriculture and Fisheries for Scotland" d'Aberdeen (Grande-Bretagne)

Qui a bien voulu nous accueillir au sein de son équipe, nous conseiller et nous guider dans nos expérimentations.

Aux Docteurs A.E. ELLIS, D. SMAIL, J. LIVERSIDGE, T. HASTINGS et D. STUART

Dont l'aide et les suggestions nous ont été précieuses.

Remerciements sincères

A Madame A.M. HATTENBERGER-BAUDOUY

Chargée de Recherches au Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires de Maisons-Alfort

Qui nous a ouvert sa bibliothèque et largement conseillé pour la rédaction de ce travail.

Qu'elle et tous les membres de son équipe trouvent ici l'expression de notre très grande reconnaissance.

PLAN

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES EN MATIERE DE FURONCULOSE DES SALMONIDES

INTRODUCTION : IMPORTANCE, HISTORIQUE DE LA MALADIE

A/ Epidémiologie

1/ Répartition géographique

a/ en eaux douces
b/ en mer

2/ Contagiosité

3/ Flambées épizootiques

B/ Etiologie

1/ Facteurs prédisposants

a/ espèce
b/ souche
c/ âge

2/ Facteurs favorisants

a/ en eaux douces
b/ en mer

3/ Facteur déterminant : la bactérie Aeromonas salmonicida
   a/ caractères morphologiques
   b/ caractères culturaux
   c/ caractères biochimiques
   d/ variétés
   e/ sérotypage
   f/ résistance

C/ Pathogénie

1/ Sources et réservoirs d'infection
2/ Voies de pénétration
3/ Virulence
4/ Toxicité

D/ Symptômes

1/ Forme suraiguë
2/ Forme aiguë
3/ Maladie chronique (localisée)

E/ Lésions

1/ Forme suraiguë
2/ Forme aiguë
   a/ Autopsie
   b/ Histopathologie
3/ Maladie chronique
   a/ Autopsie
   b/ Histopathologie

4/ Infectés latents et porteurs sains

F/ Diagnostic

1/ Epidémiologique
2/ Clinique

a/ Forme aiguë
b/ Forme chronique

3/ Expérimental

a/ Test d'agglutination sur lame
b/ Test d'hémagglutination passive
c/ Test d'agglutination par sensibilisation au latex
d/ Immunofluorescence
e/ Test de lyse par bactériophages à large spectre d'activité lytique

G/ Traitement : chimiothérapie

1/ Les Sulfamides
2/ Les Antibiotiques
3/ La Furazolidone

H/ Prophylaxie

1/ Prophylaxie sanitaire et législation

a/ A l'échelon international
b/ A l'échelon national
c/ Prophylaxie sanitaire à l'échelon de la pisciculture

- mesures défensives
- mesures offensives

2/ Prophylaxie médicale

DEUXIEME PARTIE : ETUDE DU ROLE PATHOGENE DE L'EXOTOXINE PRODUITE PAR AEROMONAS SALMONICIDA

INTRODUCTION : PROTOCOLE EXPERIMENTAL

I - MATERIEL ET METHODES

A/ Bactériologie

1/ Souches d'Aeromonas salmonicida
2/ Milieux de culture
3/ Production, récolte et séparation de l'exotoxine

B/ Poissons : inoculations, prélèvements sanguins

C/ Cultures tissulaires

D/ Leucocytes

1/ Adaptation de la méthode de Bøyum
2/ Séparation et cultures de macrophages

E/ Immuno-électrophorèse

F/ Matériel de laboratoire

II - RESULTATS

§ Effets de l'exotoxine in vitro

A/ Activité lécithinasique

1/ Culture en bouillon et sur gélose au jaune d'oeuf

2/ Test quantitatif

B/ Activité protéolytique

1/ Tests qualitatifs

a/ Culture sur gélose à la gélatine

b/ Culture sur gélose au lait écrémé

2/ Titration de l'activité protéolytique de l'exotoxine

C/ Activité hémolytique

1/ sur hématies de lapin

2/ sur hématies de truites arc-en-ciel

D/ Activité cytotoxique et cytolytique

1/ Action de l'exotoxine sur les cultures cellulaires

a/ Exposition à des concentrations décroissantes d'exotoxine pendant un temps donné

b/ Exposition à une concentration donnée d'exotoxine pendant des périodes croissantes.

2/ Action de l'exotoxine sur les leucocytes

a/ Leucocytes soumis à des dilutions d'exotoxine

b/ Macrophages soumis à des dilutions d'exotoxine

c/ Interprétation

§§ Effets de l'exotoxine in vivo

A/ Effet létal

B/ Symptômes et lésions

1/ Injection par voie intra-péritonéale

a/ Symptômes

b/ Lésions

α) Autopsie

β) Histopathologie

2/ Injection par voie intra-musculaire

a/ Symptômes

b/ Lésions

α) Autopsie

β) Histopathologie

C/ Modification des propriétés et de la composition du sang

1/ Hématocrite

a/ Expériences et résultats

b/ Interprétation

2/ Hémolyse

a/ Dosage de l'hémoglobine plasmatique après injection intra-péritonéale d'exotoxine

b/ Dosage de l'hémoglobine sanguine après injection intra-péritonéale d'exotoxine

c/ Interprétation

3/ Enzymes sériques

a/ Aldolase

b/ Créatine phosphokinase (CPK)

c/ Interprétation

§§§ Le facteur sérique de défense aspécifique

A/ Mise en évidence et caractérisation in vitro

1/ Neutralisation de l'activité hémolytique de l'exotoxine par des serums d'animaux sains

a/ Technique

b/ Expérience et résultats

c/ Interprétation

2/ Neutralisation de l'activité protéolytique de l'exotoxine par le serum de truite saine

a/ Technique

b/ Expérience et résultats

c/ Interprétation

3/ Immuno-électrophorèse

B/ Rôle de protection contre l'exotoxine in vivo

1/ Expérience et résultats
2/ Interprétation

C/ Dépression de cette activité protectrice par des injections préalables d'exotoxine

1/ Expériences et résultats
2/ Interprétation

III - DISCUSSION

CONCLUSION

§ Schéma général de la pathogénie de la furonculose, expliquée par la libération d'exotoxine par les bactéries

§§ Perspectives offertes par la connaissance de l'exotoxine dans la recherche d'un vaccin anti-furonculose.

INTRODUCTION

L'élevage des Salmonidés, qu'il soit réalisé dans un but commercial ou de repeuplement des rivières, suscite un intérêt croissant en France et dans le monde, surtout depuis l'avènement des aliments secs (qui, en remplaçant les résidus de pêche, ont permis à la fois une indépendance géographique vis-à-vis des lieux de pêche maritime et un meilleur contrôle qualitatif, quantitatif et sanitaire de l'alimentation des poissons d'élevage). Mais, comme dans tout élevage intensif, la concentration des animaux favorise le développement de maladies parasitaires et microbiennes. Si les plus à craindre sont les maladies virales (en particulier la Nécrose Pancréatique Infectieuse et la Septicémie Hémorragique Virale) qui n'admettent pas de traitement et contre lesquelles la seule lutte efficace reste la prophylaxie sanitaire, les principales bactérioses sont la cause d'un manque à gagner important qui a motivé la recherche d'une prophylaxie médicale (vaccin) efficace contre ces maladies. Alors que la vibriose peut être évitée par utilisation d'un vaccin d'ores et déjà disponible dans le commerce, il n'en est pas de même de la furonculose, contre laquelle les nombreux essais vaccinaux se sont tous soldés par des échecs.

Ce travail est une mise au point des connaissances acquises à ce jour sur la furonculose, et le compte rendu de travaux réalisés dans un laboratoire britannique qui ouvriront peut-être une voie nouvelle dans la recherche d'un vaccin anti-furonculose.

PREMIERE PARTIE

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES EN MATIERE DE FURONCULOSE DES SALMONIDES

La Furonculose est certainement la plus importante des maladies bactériennes rencontrées dans les régions salmonicoles, et la cause de mortalité la plus fréquente parmi les espèces de poissons d'élevage aussi bien que chez les espèces sauvages.

Cette maladie fut observée pour la première fois dans des établissements piscicoles de l'Allemagne du Sud en 1894, et décrite par Emmerich et Weibel. Sa présence a ensuite été signalée dans un nombre croissant d'exploitations piscicoles allemandes et plus tard elle fut observée chez des poissons sauvages en Bavière (Plehn 1909).

Existant primitivement dans l'Ouest de l'Amérique du Nord, elle était en équilibre épizootiologique avec la truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri). Lorsqu'elle atteint l'Est des U.S.A. elle devint une maladie aiguë de l'Omble de fontaine (Salvelinus fontinalis). L'introduction de la truite arc-en-ciel en Europe a accéléré l'extension de la maladie, en décimant les populations de truite brune européenne (Salmo trutta). En Grande Bretagne, la furonculose a fait l'objet d'un programme de recherches officielles de la part du Gouvernement Britannique (Rapports du Furunculosis Committee, par Mackie et al, 1930-1933-1935), à cause des pertes sévères enregistrées dans les rivières de la côte Est de l'Ecosse.

En France, c'est vers 1950 que Besse isole les premières souches de Aeromonas salmonicida, la bactérie responsable. Depuis lors, la furonculose s'est propagée sur notre territoire et rares sont les pisciculture n'ayant jamais été atteintes.

A - EPIDEMIOLOGIE

I/ REPARTITION GEOGRAPHIQUE

a/ En eaux douces

- La bactérie responsable est largement répandue en Europe, en Amérique du Nord et au Japon chez la plupart des espèces de Salmonidés. Elle n'a pas été reconnue chez les Salmonidés existant en Australie, Nouvelle Zélande, et Tasmanie ;

- En France : une enquête réalisée en 1967 par le bureau "Inspection des Produits de la Pêche et Maladies des poissons" de la Direction des Services Vétérinaires révèle que sur 87 départements ayant fourni des informations, 63 sont infectés de furonculose (Gousset et Tixerant). Environ 30 % des exploitations salmonicoles sont atteintes, tant pour l'ensemble du territoire que pour les dix premiers départements producteurs. Les deux zones les plus affectées sont le Nord-Ouest (Bretagne, Normandie) et le Sud-Est, où les départements de l'Ain et du Jura accusent un taux d'infection particulièrement élevé.

b/ En Mer

La furonculose a été signalée dans des pisciCultures (Novotny 1978) de saumon du Pacifique (Oncorhynchus kisutch).

En Norvège, une maladie du saumon atlantique (Salmo salar) diagnostiquée initialement comme pasteurellose (Hastein et Bullock 1976) s'est depuis révélée être causée par une souche atypique de Aeromonas salmonicida.

La transmission latérale entre pisciCultures marines a été observée, mais on n'a jamais encore signalé la maladie chez les salmonidés capturés en haute mer.

La bactérie a par ailleurs été mise en évidence sur un poisson marin, le "sable-fish" (Anoplopoma fimbria) (Evelyn, 1971).

2/ CONTAGIOSITE

Le bacille survit entre les épizooties dans le rein et l'intestin de poissons porteurs sains, de même que dans l'eau, sur les végétaux et dans les sédiments (Dubois-Darnaudpeys, 1978). Des poissons d'espèces non-salmonidées peuvent également jouer un rôle dans la transmission.

3/ FLAMBEES EPIZOOTIQUES

Quand le porteur est suffisamment exposé aux stress des facteurs d'environnement, il y a multiplication active du bacille, extériorisation de la maladie et dissémination de l'infection dans la population, se tra-

duisant par une mortalité brutale des jeunes poissons (ceci est observé par exemple au moment du transfert de smolts infectés dans de nouvelles pisciculture).

B - ETIOLOGIE

I/ FACTEURS PREDISPOSANTS

a/ Espèce

- Toutes les espèces de Salmonidés sont affectées, mais à un degré de gravité variable :

* L'omble de fontaine (Salvelinus fontinalis) et le Saumon Atlantique (Salmo salar) sont particulièrement sensibles ;

* La truite Fario (Salmo trutta fario) l'est moins

* La truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri) semble plus résistante ;

- Le bacille a été mis en évidence chez douze autres espèces de poissons de diverses familles (vairon, tanche, carpe, brochet, perche, silure...) qui peuvent dans certaines conditions extérioriser la maladie (Mackie et al, 1935 ; Mc Craw, 1952 ; Herman, 1968 ; Mc Fadden, 1970) ;

- Aucune espèce de poisson ne peut être considérée comme absolument réfractaire (Plehn, 1924 ; Mc Craw 1952 ; Schaperclaus, 1954).

b/ Souche

Certaines souches d'ombles de fontaine, sélectionnées dès 1925 par Embody et Hayford, sont plus résistantes à la furonculose que les autres.

c/ Age

- Les jeunes individus ont une maladie aiguë, rapidement mortelle ;

- Chez les animaux plus âgés, la bactérie se localise généralement sous l'épiderme, induisant la formation de furoncles caractéristiques de la forme chronique de la maladie.

2/ FACTEURS FAVORISANTS

a/ En eaux douces

- La baisse du taux d'oxygène dissous
- Une température élevée : la maladie apparaît au printemps ou en été, regresse à l'automne.
- Une alimentation défectueuse : en qualité (par carences protéiques), ou en quantité
- Une forte concentration d'animaux : dans les élevages en cages ou en bassins où la densité de population est élevée.
- Les stress de manipulation : tels que les changements de bassins, les manipulations au moment du frai...

b/ En mer

- Le stress de transfert des smolts d'eau douce en eau de mer. Chez le saumon atlantique, les mortalités débutent souvent dans les quelques jours qui suivent le transfert. Cependant quand la maladie s'est installée dans la population, les mortalités continuent pendant très longtemps.

- La température : bien que les températures élevées accélèrent le cours de la maladie, elles ont un rôle contesté dans l'apparition de celle-ci ;
La furonculose se déclenche à des températures variant entre 4 et 16°C (expériences sur saumon atlantique). Scott (1968) enregistre la transmission à des conditions de températures variant entre 5, 6 et 14, 5° C ; et Novotny (1978) enregistre une recrudescence à des températures déclinant (automne) dans une population ayant souffert de la maladie clinique pendant les mois d'Eté.

- Les Stress de manipulations, les tris et mesures déclenchent parfois des flambées épizootiques, qui peuvent continuer même à des températures habituellement jugées défavorables au bacille.

- Une maladie intercurrente : Novotny (1978) rapporte que la vibriose, installée dans une population de juvéniles de saumons chinook (Oncorhynchus tschawytscha) en eau de mer, a déclenché une flambée de furonculose, produisant jusqu'à 93,5% de mortalité (la vibriose seule n'induisant qu'une mortalité de 3% maximum).

3/ FACTEUR DETERMINANT : la bactérie Aeromonas salmonicida (appartenant à la famille des Vibrionaceae)

a/ Caractères morphologiques

Il s'agit d'un Coccobacille (I,3 à 2 µx 0,8 à I µ),Gram négatif, Asporogène, immobile, dont la forme et la taille sont régulières, et possédant un flagelle polaire.

b/ Caractères culturaux

C'est un Aeroanaerobie facultatif (sa croissance est très réduite en l'absence d'oxygène)

- La température optimale de croissance est de 22°C. Cette croissance est lente à + 4°C, nulle à 37°C.

- Les souches R (Rough)

Sédimentent en bouillon, s'auto-agglutinent dans du soluté de chlorure de sodium à 9‰ , et forment des colonies ternes et compactes sur milieu solide (gélose "furonculose" ou gélose au sang)

- Les Souches S (Smooth)

Produisent une turbidité uniforme en bouillon;

Sur milieu solide, les colonies sont très brillantes et friables.

- La plupart (mais non toutes) des souches produisent sur milieu contenant de la tyrosine en abondance un pigment mélanique brun, hydrosoluble.

Les variations dans la quantité de pigment produit et le temps de latence avant son apparition, ainsi que la variabilité dans la production sont connues depuis longtemps (Horne, 1928 ; Duff et Stewart, 1933).

La proximité de colonies d'autres bactéries peut inhiber la production de pigment.

c/ Caractères biochimiques - (d'après Dubois Darnaudpeys 1976)

Glucose	+
Oxydase	+
Lactose	-
Maltose	+
Saccharose	-
Réduction des nitrates	+
Citrate	-
Mannitol	+
Rhamnose	-
Galactose	+
Amidon	+
Esculine	+
H2S	-
Urée	-
Indole	-

d/ Aeromonas salmonicida se subdivise en trois variétés :

- Aeromonas salmonicida salmonicida : souches "classiques"
- Aeromonas salmonicida achromogenes : souches atypiques venant de Salmonidés (cette variété inclut les isolats "masoucida" de Kimura, 1969).

- Aeromonas salmonicida nova : il s'agit d'un nouveau groupe de souches atypiques provenant de Cyprinidés et autres espèces non-Salmonidés.

Les tableaux des pages 20, 21 et 22 indiquent les tests biochimiques d'identification du genre Aeromonas (Tableau 1), de l'espèce Aeromonas salmonicida (Tableau 2), et des différentes variétés au sein de cette espèce (Tableau 3) (Techniques décrites par Erwing et al, 1961).

e/ Sérotypage

La conformation sérologique de Aeromonas salmonicida reste à déterminer de façon définitive, et donne lieu à controverses. Duff (1939) indique une hétérogénicité, tandis que Blake et Anderson (1930) ne trouvent pas de différence sérologique entre 80 souches d'origines très diverses. Plus récemment, Karlsson (1964) ne peut détecter de différence entre les antigènes thermolabile et thermostable de Aeromonas salmonicida, tandis que Kimura (1969) enregistre la présence d'un antigène thermolabile additionnel dans la variété "masoucida". Popoff (1979) et Mc Carthy et Rawle (1975) arrivent aux mêmes conclusions que Karlsson.

Actuellement, on considère l'existence d'un sérotype unique, et les méthodes sérologiques pour l'identification de Aeromonas salmonicida sont fondées sur cette supposition. Une étude comparative détaillée, incluant des souches atypiques d'Aeromonas salmonicida, devrait apporter des éclaircissements dans ce domaine.

TESTS D'IDENTIFICATION DE AEROMONAS SALMONICIDA

TABLEAU 1

Microorganisme	Test Oxygène	Test du métabolisme du glucose	Flagelle	0129
Aeromonas	+	F	polaire	R
Pseudomonas	+	O	polaire	R
Vibrio	+	F	polaire	S
Enterobactéries	-	F	peritriche	R

F = Catabolisme fermentatif du glucose

O = Catabolisme oxydatif ou non catabolisme du glucose

R = Résistant S = Sensible

0129 = Vibriostat 10ug/ml

TABLEAU 2

Test	A. salmonicida	A. hydrophila	Org.Pasteurel-la-like
longueur/largeur	2	2	2
mobilité	-	+	-
croissance à 40°C	-	+	-
production pigm.	+	-	-
antiserum A.s.	+	-	-
production ind-le	-	+	v
catab. sucrose	-	+	+
util. de butyrate	v	+	NT
phosphodiaminidase	+	v	NT
% moles G+C dans l'ADN	55 à 57,6	58,4 à 60,9	36,5 à 43

+ = 90 % des souches +

- = 90 % des souches -

v = réaction variable

NT = non testé

TABLEAU 3

Tests	A. s. salmonicida	A.s.achromogenes	A.s.nova
prod.pigment	+	v	-
catab.methylDglucoside	+	-	-
glycerol	+	+	-
esculine	+	v	v
trehalose	v	+	-
dextrine	+	+	v
Nacetylglucosamine	+	v	v
salicine	v	-	-
Util. serine	+	v	v
alanine	+	v	v
glycerate	-	v	+
Glucosidase	+	-	v
Phosphodiesterase	+	v	v
Lipase (C4)	+	v	v
NacetylDgalactosaminidase	+	v	v
D xylosidase	v	-	-
Lyase formique - H2	+	v	v
Lecithinase	+	v	v
Arginine decarboxylase	+	v	v
Sensib. à céphaloridine (15 ug/ml)	+	-	v
Reduct. des nitrites	+	v	v
Prod. d'acetoïne	-	v	v

+ = 90 % des souches +

- = 90 % des souches -

v = réaction variable

f/ Résistance

Aeromonas salmonicida est un bacille pathogène obligatoire, mais capable de survie prolongée dans l'environnement. D'après Mc Carthy (1977), la durée de survie est de 17 jours en eau douce, 24 jours en eau saumâtre ; en ce qui concerne l'eau de mer, les chiffres publiés varient selon les auteurs : pour Mc Carthy (1977) elle est de 8 jours, pour Lund (1967) de 4 à 6 jours et pour IW Smith de 21 à 26 jours.

Dubois-Darnaudpeys (1976) montre que le bacille survit au moins 9 mois à 4°C dans l'eau distillée, au moins 32 mois dans les sédiments ou la végétation, à 4°C, et que cette survie est meilleure à un pH neutre que légèrement acide (6,1-6,5) ou légèrement alcalin (8,2). Elle est d'autre part maximale pour des températures comprises entre 10 et 14°C.

Mc Carthy (1977) démontre aussi la survie sur filets de pêche, fonds de bassins (jusqu'à 29 jours) et dans les tissus des poissons morts de la maladie (jusqu'à 30 jours). De plus, Cornick et al (1969) découvrent des bactéries en vie sur des tissus de poissons infectés stockés à - 10°C.

C - PATHOGENIE

1/ SOURCES ET RESERVOIRS D'INFECTION

La transmission se fait de poisson à poisson ou à partir d'oeufs embryonnés, des eaux ayant abrité des poissons infectés, de la nourriture mélangée aux matières

fécales des poissons atteints, ou de porteurs asymptomatiques. Les poissons malades sont la principale source d'infection mais l'environnement joue également un rôle important.

La propagation cesse quand la densité du peuplement est faible (environ 2,5 poissons/m3 d'eau).

2/ VOIES DE PENETRATION

Les trois principales voies de pénétration de la bactérie sont les suivantes :

- digestive
- percutanée : au niveau de la ligne latérale, ou à l'occasion de légers traumatismes
- branchiale

3/ VIRULENCE

Les bactéries se multiplient activement dans les organes richement vascularisés (branchies, foie, coeur) et de filtration du sang (rate, rein).

4/ TOXICITE

Aeromonas salmonicida produit des toxines de deux types :

- des endotoxines n'ayant pas d'activité toxique reconnue (Paterson, 1972)

- des exotoxines, aux activités toxiques importantes :
  lecithinasique (Esselmann et al, 1960),
  hemolytique (Karlsson, 1962),
  protéolytique (Shieh et al, 1975),
  leucocytolytique (Fuller et al, 1977)

D - SYMPTOMES

Le temps d'incubation moyen est de 2 à 3 jours

1/ FORMES SURAIGUE

La mort survient brutalement, sans signes cliniques.

2/ FORME AIGUE

Le tableau clinique est relativement peu caractéristique :

- La nage devient lente, incertaine, en vrille, en surface
- Le tégument prend une teinte plus sombre
- Les mouvements des opercules deviennent irréguliers
- L'inappétance est totale
- On observe une rapide et spectaculaire chute de l'hématocrite (de 37-48 à moins de 20). Ce phénomène est si soudain chez les individus atteints de furonculose aiguë que des mesures d'hématocrite peuvent donner aisément une idée de l'étendue de la maladie dans une population.
- La mort survient au bout de 24 à 48 heures.

- Au plus fort d'une épizootie, la mortalité quotidienne peut atteindre 10 % de la population totale.

3/ MALADIE CHRONIQUE (localisée)

Au début de l'épizootie, de nombreux poissons montrent les signes extérieurs caractéristiques de la furonculose chronique : un ou plusieurs "furoncles" (tuméfactions de teinte foncée) en net relief, sur le dos ou les flancs. Ces "furoncles" qui, à leur plein développement peuvent s'étendre sur le tiers de la longueur du poisson, s'ulcèrent parfois (par rupture du tégument) et apparaissent alors remplis d'un liquide rouge-brun abondant, et les muscles de la périphérie sont détruits. Puis on assiste invariablement à une précipitation du processus, et les poissons meurent après avoir présenté les symptômes de la maladie aiguë.

E - LESIONS

1/ FORME SURAIGUE

De type septicémique, elle se caractérise par l'absence de lésions.

2/ FORME AIGUE

a/ Autopsie

- les branchies sont congestionnées et saignent très facilement quand on presse les opercules

- On observe des hémorragies à la base des nageoires
- Dans la cavité générale, on trouve un liquide sanguinolant abondant, le foie est congestionné et la rate hypertrophiée.

b/ Histopathologie

Les bacilles sont concentrés dans les organes richement vascularisés (branchies, coeur, foie) et de filtration du sang (rein, rate). Parfois les bactéries envahissent également le tube digestif (au niveau de la sous-muqueuse) et les organes génitaux. L'absence de réaction inflammatoire est générale.

- Rein antérieur : jusqu'à 10% du volume du tissu hématopoïétique peut être occupé par des bacilles. Il est localement nécrosé, oedémacié, et de nombreux débris cellulaires sont visibles. Les capillaires semblent avoir perdu leur intégrité par nécrose de l'endothélium vasculaire et formation de thrombus. Ailleurs il y a hyperplasie du tissu hématopoïétique avec dispersion de mélanomacrophages.

- Rein postérieur (excréteur) : on observe une nécrose glomérulaire et tubulaire, une hémorragie et un oedème localisés.

- Rate : on observe un important déficit en hématies, et 5 à 10 % du volume du tissu peut être occupé par des bacilles. Les colonies bactériennes sont en général associées à des plages d'hémosidérine et à une nécrose localisée des ellipsoïdes. La structure normale de la rate a disparu.

- Branchies : les bacilles se multiplient à la base des lamelles secondaires, et provoquent des embolies. Il y a une hyperplasie marquée autour de ces embols, résultant de l'hypertrophie épithéliale et de la fusion des lamelles secondaires. Dans les lésions les plus sévères les capillaires des lamelles primaires apparaissent obstrués, causant des anévrismes et des hémorragies qui libèrent des bactéries, du sang et des débris nécrotiques.

- Coeur : la principale lésion observée est une épicardite ventriculaire extensive : nécrose de l'épicarde et destruction du collagène de l'espace sous épicardique en présence de nombreux bacilles. Parfois le myocarde ventriculaire est atteint et des amas de bacilles sont disséminés dans ses couches corticale et spongieuse, provoquant une nécrose liquéfactive. On trouve en outre une nécrose fibrinoïde des couches externe et moyenne des vaisseaux coronaires, et fréquemment des thrombus sur l'endothélium coronarien.

- Foie et vésicule biliaire : le foie est ischémique et oedémateux ; les sinusoïdes distaux des espaces péri-portes sont envahis de colonies bactériennes ; autour des amas de bacilles, on trouve une couronne d'hépatocytes nécrosés.

L'infection peut se développer dans la paroi de la vésicule biliaire, les bacilles se localisant dans la couche aréolaire sous l'épithélium squameux superficiel.

- Tube digestif : c'est l'un des organes qui n'est ordinairement pas affecté dans la maladie aiguë. Occasionnellement des colonies bactériennes se localisent dans la sous-muqueuse surtout au niveau des coecums pyloriques. Il y a généralement une distension marquée des espaces lymphatiques dans la musculeuse du tube digestif, en région pylorique. Apparemment il n'y a pas de modification des fonctions exocrine et endocrine du pancréas, ni atteinte du tissu adipeux environnant. Cette inconstance des lésions du tube digestif est importante, car elle suggère qu'une pénétration du bacille par voie digestive est peu probable.

- Gonades : occasionnellement des bacilles sont trouvés dans les ovaires. Ils sont localisés au tissu conjonctif intersticiel et sont apparemment absents des follicules.

3/ MALADIE CHRONIQUE

a/ Autopsie

- La taille des "furoncles" n'est pas en rapport avec l'importance des lésions musculaires et donne peu d'indications sur leur étendue en profondeur. En effet on découvre à la section de vastes sinus caverneux remplis d'un liquide rouge-brun. La fonte tissulaire est considérable (des myomères entiers ont été détruits).

- A l'ouverture de la paroi abdominale, on observe une hémorragie interne variant de quelques pétéchies sur les parois de la cavité et des viscères, à de grosses taches hémorragiques sur les séreuses avec fluide sanguinolant dans la cavité générale et le sac péri-

cardique.

- Parfois on observe des adhérences viscérales.

- Le foie est décoloré, avec quelques taches hémorragiques sous-capsulaires.

- Le tube digestif est contracté, congestionné et contient de la bile en grande quantité et de petits amas fécaux épars.

- La rate est hypertrophiée

b/ Histopathologie

Les lésions précoces de la maladie chronique ne se distinguent pas macroscopiquement des "furoncles" ulcérés. Mais contrairement à ceux-ci, elles sont superficielles ; de plus les bactéries sont souvent difficiles à trouver au niveau de ces lésions, bien que leurs effets soient évidents : des fibres musculaires sont nécrosées, laissant des débris entourés d'hématies. Il y a peu ou pas de réaction inflammatoire. Le tégument, initialement endommagé, subit une réparation temporaire qui masque ces lésions précoces, mais n'en signifie pas pour autant la guérison.

Les lésions secondaires, profondes, constituent les "furoncles" ou "abcès" : le tissu musculaire est oedémacié, avec une accumulation considérable de sang et de débris entre les plans musculaires, à la fois en profondeur et latéralement le long des fascia. Sous le tégument il y a de profondes modifications né-

crotiques dans le tissu adipeux de l'hypoderme, le stratum compactum du derme perd localement son intégrité, est investi par des cellules sanguines et apparemment cède sous la pression de liquide. Ce liquide n'est pas du pus (la dénomination de "furoncle" ou d'"abcès" est donc fausse), mais seulement le produit de liquéfaction du tissu musculaire. Sur le pourtour des lésions il y a une croissance bactérienne importante : l'extension latérale de la lésion sous le stratum compactum avec sa zone frontale riche en bacilles paraît souvent précéder la rupture du tégument. L'hypoderme est apparemment particulièrement vulnérable à la colonisation bactérienne qui cause la nécrose des cellules adipeuses et l'hémorragie (les bactéries sont souvent localisées dans la couche pigmentaire de l'hypoderme).

Donc le trait le plus marquant de la furonculose chronique reste la nécrose musculaire extensive et l'hémorragie souvent à bonne distance de la localisation des bactéries (l'endothélium vasculaire est endommagé, causant une fuite de globules rouges et de fluide dans les tissus affectés).

Quoique très importantes, les lésions sont limitées aux muscles et téguments. Mais ceci est un stade transitoire qui mène habituellement à l'établissement des bactéries dans d'autres tissus, ce qui détermine le passage à une phase aiguë de la maladie (bactériémie et mort).

Il semble donc que l'origine de l'infection évoluant sur un mode chronique soit percutanée à travers

de petites lésions existantes ou même la ligne latérale. La dissémination consécutive le long des plans musculaires et à travers le tissu adipeux de l'hypoderme aux myomères adjacents se réalise, le point d'entrée d'origine pouvant être perdu. La rupture secondaire du tégument avec atrophie de l'épiderme laisse une plaie suintante.

La furonculose chronique provient de la pénétration d'une quantité limitée de bacilles dans le tégument donnant le développement d'une lymphangiectasie et l'apparition de "bubons" de type peste. La furonculose aiguë provient au contraire d'une pénétration massive de bactéries, probablement à travers les branchies, amenant rapidement une bactériémie fatale.

4/ INFECTES LATENTS ET PORTEURS SAINS

A n'importe quel âge, les Salmonidés, qu'ils soient sauvages ou d'élevage, peuvent être des porteurs sains. La détection se fait par culture de la bactérie à partir de tissus, ou en soumettant les poissons à un stress et en leur injectant des corticostéroïdes : on obtient une furonculose associée à la réponse au stress. Le taux des porteurs dans une population varie en fonction des espèces et des circonstances environnantes.

F - DIAGNOSTIC

1/ EPIDEMIOLOGIQUE

Les données suivantes orientent le diagnostic: la région (Nord-Ouest ou Sud-Est de la France) ;

la saison (printemps, été) ;
un faible taux d'oxygène dissous dans l'eau ;
des conditions de stress des poissons ;
une mortalité importante des jeunes poissons ;
la coexistence de formes aiguës et chroniques (très nombreuses au début de l'épizootie).

2/ CLINIQUE

a/ Forme aiguë

Les jeunes poissons surtout sont atteints : couleur sombre, nage ébrieuse, mouvements irréguliers des opercules, mort rapide.

Les lésions se situent principalement au niveau des organes richement vascularisés et de filtration du sang.

b/ Forme chronique

La présence des "furoncles" caractéristiques associés ou non à des symptômes généraux, et l'existence de lésions tégumentaires et musculaires amènent une forte suspicion de furonculose.
Mais il est impossible de différencier sans équivoque par les seuls signes cliniques la furonculose des autres maladies causées par des bactéries Gram-négatives.

3/ EXPERIMENTAL

L'identification de Aeromonas salmonicida doit être précoce, rapide et sûre pour permettre l'application du traitement.

a/ Test d'agglutination sur lame

Mis au point par Rabb et al (1964), ce test n'est applicable qu'à condition que les cellules ne s'auto-agglutinent pas dans le serum physiologique. Malheureusement la grande majorité des souches isolées à partir de poissons s'auto-agglutinent très fortement (souches R). Williamson (1929) trouve même que les souches s'auto-agglutinent fortement dans du soluté très dilué (0,1%) et même dans l'eau distillée. Certains auteurs ont proposé diverses méthodes pour éviter ce phénomène : utilisation de soluté salé dilué (Duff, 1939), ultrasons pour disperser les agglutinats (Karlsson, 1964) mais la fiabilité de ce test reste limitée.

b/ Test d'hémagglutination passive

Mise au point par McCarthy et Rawle (1975), cette méthode, pour laquelle on n'a pas constaté de réaction croisée avec aucune autre bactérie pathogène pour les poissons ni d'interférence par des hémolysines ou agglutinines anti-globules rouges de mouton, est applicable à l'identification des souches S et R de Aeromonas salmonicida ; elle permet l'examen au bout de vingt-quatre heures de cultures de croissance lente et de pigmentation faible ou absente, et aussi de cultures impures, envahies par des bactéries de contamination.

Cependant, occasionnellement des souches vieilles maintenues dans la gélose ne réagissent pas: elles peuvent ne pas être adéquates pour des études sérologiques ou pour l'élaboration de vaccins, même après passage sur poissons.

c/ Test d'agglutination par sensibilisation au latex

Mis au point par McCarthy (1975-1977), il permet en deux heures un diagnostic quasi-instantané et sûr de la furonculose. Cette méthode vise à déceler, dans un extrait de tissu de poisson examiné, les antigènes recueillis par les particules de latex porteuses de globulines.

Cette méthode présente au surplus l'avantage de se prêter à tous les tissus de poisson, qu'ils soient fixés au formol, congelés à coeur ou même envahis par des germes de putréfaction. Elle rend de grands services dans la recherche de souches atypiques, particulièrement dans les lésions cutanées.

d/ Immunofluorescence

Mise au point par McCarthy et Whitehead (1977) qui utilisent un marquage à l'encre de chine, cette technique permet de localiser l'antigène microbien au sein des tissus infectés.

e/ Test de lyse par bactériophages à large spectre d'activité lytique

Cette technique, mise au point par Popoff (1971), fait intervenir des réactions lytiques nettes et spécifiques des Aeromonas salmonicida (souches S ou R).

G - TRAITEMENT : CHIMIOTHERAPIE

Les différents produits proposés pour le traitement de la furonculose ont fait l'objet d'une revue détaillée par Herman, en 1968. On utilise principalement actuellement :

1/ LES SULFAMIDES

- simples : la sulfamérazine (l'un des deux seuls produits autorisés aux U.S.A.) est utilisée pour le traitement des truites arc-en-ciel, des truites fario et des ombles de fontaine ; ceci à la dose orale quotidienne de 200 mg/kg de poids vif.
  D'autres sulfamides lui sont parfois substitués (à doses identiques) : sulfazoxazole, sulfamethazone surtout.

- potentialisés : triméthoprime
  Bullock et al. (1974) et McCarthy et al (1974) ont démontré l'efficacité très grande des sulfonamides associés à un potentialisateur, qui bloquent tous les deux la synthèse

bactérienne d'acide dihydrofolique (essentiel dans la synthèse des bases puriques), mais en des points différents de la chaine biosynthétique. Ce blocage séquentiel est hautement efficace et aboutit à une activité bactéricide.
Un mélange souvent employé se compose de 5 parties de sulfamérazine pour une partie de triméthoprime.

2/ LES ANTIBIOTIQUES

- Chloramphénicol (50 mg/kg), de moins en moins employé du fait de résistances bactériennes ;
- Oxytétracycline : pour tous les Salmonidés, à la dose orale quotidienne de 50-80 mg/kg de poids vif.

3/ LA FURAZOLIDONE

A la dose quotidienne per os de 50 à 75 mg/kg de poids vif, elle est utilisée pour traiter des infections réfractaires à la sulfamérazine et à l'oxytétracycline.

A tout traitement chimiothérapique doit être associée une hygiène très stricte. De plus, pour être efficace, le traitement doit être administré pendant un temps suffisant, dix jours en général. Tout traitement doit cesser au moins trois semaines avant la commercialisation des animaux.

H - PROPHYLAXIE

1/ PROPHYLAXIE SANITAIRE ET LEGISLATION

a/ A l'échelon international

Le Code Zoosanitaire International (dernière édition 1976) définit les règles zoosanitaires recommandées par l'Office International des Epizooties dans les échanges internationaux d'animaux et de produits animaux. En ce qui concerne la furonculose, inscrite sur la liste des maladies ichtyaires les plus redoutables (à côté de la Nécrose Pancréatique Infectieuse et de la Septicémie Hémorragique Virale des Salmonidés, et de la Virémie Printanière des Cyprinidés), sont réglementés les échanges internationaux de poissons et d'oeufs embryonnés (cf. pages 39 et 40), qui doivent obligatoirement être accompagnés d'un certificat zoosanitaire du modèle ci-joint (pages 41 et 42).

Chapitre 4.7.3.
FURONCULOSE DES SALMONIDES

Article 4.7.3.1.

Dans l'application des mesures prévues au présent Code, les Administrations compétentes des pays importateurs tiennent compte :

en ce qui concerne les Salmonidés

de la présentation d'un Certificat délivré par l'Autorité compétente attestant que :

1/ les poissons ne présentent aucun signe clinique ou anatomo-pathologique de Furonculose ;

2/ les poissons proviennent d'une exploitation de pisciculture où il n'a été constaté officiellement au cours des douze mois précédant leur exportation aucun signe clinique ou anatomo-pathologique de Furonculose ;

3/ les poissons n'ont pas été soumis depuis au moins un mois à un traitement contre la Furonculose.

Article 4.7.3.2.

Dans l'application des mesures prévues au présent Code, les Administrations compétentes des pays importateurs tiennent compte :

en ce qui concerne les oeufs embryonnés de Salmonidés,

de la présentation d'un Certificat délivré par l'Autorité compétente attestant que :

1/ les oeufs embryonnés proviennent d'une exploitation de pisciculture régulièrement inspectée;

2/ Aucun cas de Furonculose des Salmonidés n'a été constaté officiellement dans l'exploitation de pisciculture au cours des douze mois précédant l'exportation des oeufs embryonnés ;

3/ les oeufs embryonnés ont été soumis à un traitement reconnu par l'O.I.E. comme étant de nature à détruire Aeromonas salmonicida et toutes bactéries pathogènes véhiculées par les oeufs.

Modèle de Certificat n°15

MODELE DE CERTIFICAT ZOO-SANITAIRE
POUR LES POISSONS D'ELEVAGE
ET LES OEUFS EMBRYONNES DE POISSONS
FAISANT L'OBJET D'ECHANGES INTERNATIONAUX

Pays exportateur.....
Ministère de :.....
Service :.....
Département ou District, etc.....

I - Nombre et identification des poissons

Espèce	Taille moyenne	Quantité d'oeufs embryonnés de poissons

II - Provenance

Nom et adresse de l'exportateur.....
Lieu d'origine des poissons.....
Lieu d'origine des oeufs embryonnés.....

III - Destination

Pays de destination :.....
Nom et adresse du destinataire.....
Nature et identification du moyen de transport.....

IV - Renseignements sanitaires

Je soussigné certifie ce qui suit :

a) Les poissons d'élevage et/ou les oeufs embryonnés de poissons proviennent d'une exploitation de pisciculture régulièrement inspectée ;

b) Les poissons d'élevage et/ou les oeufs embryonnés de poissons proviennent d'une exploitation satisfaisant aux dispositions ci-après :

/Ces conditions sont établies d'un commun accord entre les Services Vétérinaires responsables des pays importateurs et exportateurs et choisies entre les options prévues dans le Code./

Cachet officiel :

Fait à ..... le.....
(Nom et adresse)
.....

Signature :

La coordination, sous l'égide de l'Office International des Epizooties, des renseignements scientifiques, des recherches et des règlements, s'est largement développée ces dernières années, dans le cadre du programme de recherche en aquaculture (dont la dernière session s'est tenue à Munich en 1979).

b/ A l'échelon national

La législation sanitaire a été précisée en France par la circulaire ministérielle D.S.V. N°1012 C du 21 Août 1969, encore en vigueur actuellement.

Cette circulaire se propose d'établir un contrôle sanitaire officiel des élevages de Salmonidés. Les buts de ce contrôle sont les suivants :

- accroître la production en diminuant les pertes dues aux maladies contagieuses ;
- faire bénéficier les échanges de poissons d'élevage et d'oeufs embryonnés de la garantie qu'offre un certificat sanitaire ;
- harmoniser à l'intérieur du territoire les mesures que l'on est amené à prendre aux frontières.

En 1978 le nombre des salmonicultures inscrites au contrôle sanitaire était de 128 ; aujourd'hui il est de 180 (sur un effectif de 700 établissements environ) Ce nombre croît relativement lentement ; les raisons en sont diverses, la principale étant l'absence de mesures financières permettant de favoriser les produits sains.

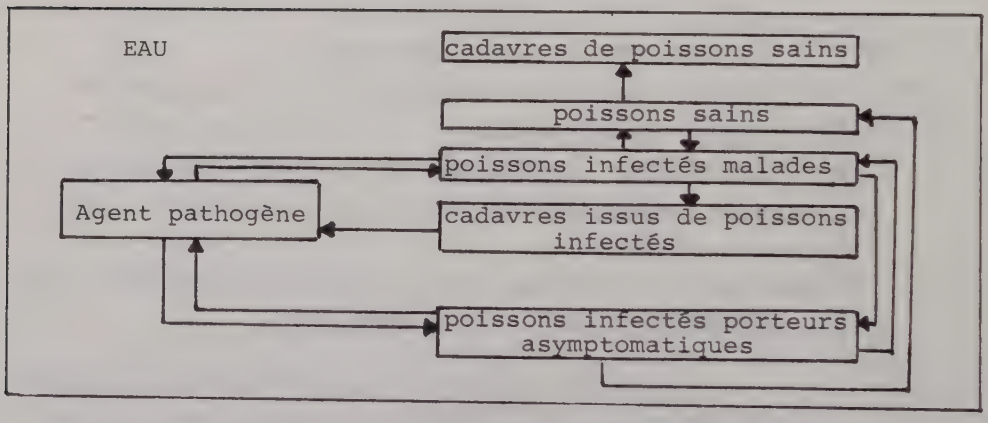
Une nouvelle législation sanitaire est en cours d'élaboration, qui prendra en compte les maladies contagieuses telles que la Septicémie Hémorragique Virale, la Nécrose Pancréatique Infectieuse, la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse et la Myxosomose ; elle exclut la Fu-

ronculose qui, contrairement aux maladies précitées, est d'une éradication quasi-impossible et de plus admet un traitement.

c/ Prophylaxie sanitaire à l'échelon de la pisciculture

∝) Mesures défensives

- circulation de l'agent pathogène dans le milieu naturel (d'après Aribert-Desjardins, 1978)



- Principes d'hygiène

Une vigilance particulière doit être exercée dans les domaines suivants :

* La qualité des reproducteurs : il faut

. s'assurer que les géniteurs ne sont pas porteurs asymptomatiques; l'examen sérologique ne doit faire apparaître aucun anticorps d'Aeromonas salmonicida

. Sélectionner des souches résistantes en vue de la reproduction : plusieurs pisciculture de l'Est des U.S.A. entretiennent des souches d'ombles de fontaine sélectionnées par Embody et Hayford et les élèvent sans essuyer de lourdes pertes dues à la furonculose (Ehlinger 1964).

* Une grande méfiance, pour éviter l'exposition à la maladie, à l'égard de tout ce qui entre dans l'exploitation : il faut :

. l'isolement rigoureux de tout l'établissement
. Un système autonome d'approvisionnement en eau
. Le maintien des poissons dans une eau non contaminée
. Empêcher l'intrusion de poissons sauvages dans l'exploitation
. Se procurer des oeufs embryonnés provenant d'établissements certifiés exempts de furonculose, ou les désinfecter par des iodophores (McFadden, 1969)
. Mettre les nouveaux stocks en quarantaine
. Veiller à ce que les installations d'alevinage soient exemptes de poissons atteints de furonculose depuis au moins un an.

* La destruction des agents pathogènes à l'extérieur du poisson : désinfection du matériel, équipements...

- Règles de l'hygiène quotidienne d'un établissement indemne : le maintien de la salubrité exige de :

. toujours veiller à maintenir la séparation entre élevage d'alevins (circuit d'eau indépendant, si possible alimenté par une source) et élevage de reproducteurs : aucun matériel ou équipement ne doit être commun ;
. veiller à la propreté rigoureuse du matériel ;
. enlever régulièrement les cadavres ;
. éviter le surpeuplement ;
. surveiller la température et le taux d'oxygène dissous de l'eau ;
. donner aux poissons une alimentation qualitativement et quantitativement appropriée, distribuée de façon homogène.

β) Mesures offensives

En zones d'enzootie, les mesures précédentes s'avèrent le plus souvent inefficaces, et il n'existe pas de prévention systématique. Aussi dès les premières mortalités convient-il de distribuer l'antibiotique approprié à la sensibilité des bactéries après avoir prélevé des poissons non traités en vue du diagnostic de certitude et de l'antibiogramme. La distribution d'antibiotiques se fait sous forme d'aliments supplémentés et après diagnostic de laboratoire pendant un temps suffisant (au moins dix jours après disparition de la mortalité), à la dose thérapeutique.

Il faut noter toutefois que la pisciculture n'est pas une entité mais un élément du système, car les eaux ne sont pas pathologiquement closes. L'unité d'intervention prophylactique doit donc être le bassin hydrographique. Quand sur un bassin hydrographique, la majorité des élevages sera inscrite au contrôle, des mesures prophylactiques devront être rendues obligatoires.

2/ PROPHYLAXIE MEDICALE

Du fait de l'antibiorésistance croissante et de la très large répartition du bacille, la salmoniculture a de plus en plus de problèmes de contrôle de la furonculose. Les récents succès de vaccins anti-vibriose (Antipa et Amend, 1977) ont relancé la recherche d'un vaccin anti-furonculose. Dès 1940 Smith a démontré que les poissons étaient capables de produire des anticorps anti-Aeromonas salmonicida. Krantz et al (1963, 1964) ont montré que les truites arc-en-ciel et les ombles de fontaine développaient des agglutinines anti-Aeromonas salmonicida par injection parentérale de bactéries tuées au formol. Ils montrèrent aussi qu'une émulsion antigénique d'huile minérale augmentait les titres de façon importante. Paterson et Fryer (1974) montrèrent que les juvéniles de saumon coho produisaient des titres élevés d'anticorps agglutinant dans une gamme de températures considérable (plus lentement aux températures plus basses).

Des vaccins oraux ont été essayés avec des résultats variables (Duff, 1942 ; Krantz et al, 1964).Klontz et Anderson (1970) ont utilisé un antigène hydrosoluble

précipité par l'alun à partir de bactéries, avec un succès notoire dans des conditions expérimentales bien contrôlées en laboratoire, mais ont été incapables de confirmer l'efficacité de leur préparation vaccinale sur le terrain (à grande échelle, la protection n'est pas satisfaisante).

Selon Anderson (1973) : "On n'a pas clairement établi que la présence d'un anticorps humoral soit nécessaire chez le poisson pour obtenir une protection contre les maladies, et, pour le moment, les décisions relatives à la quantité de substance à inoculer, aux voies à suivre pour l'injection et au calendrier des mesures à prendre restent arbitraires et il est nécessaire de procéder à des examens complémentaires en effectuant des essais parallèles de différentes préparations de vaccins". En effet, l'absence d'un vaccin anti-furonculose commercialisé montre à l'évidence qu'aucun de ceux élaborés en laboratoire n'est encore prêt à un usage généralisé. Tous ces vaccins expérimentaux ont été préparés à partir de bactéries entières, de parois bactériennes ou de fractions de protéines bactériennes, et leur efficacité a été mesurée par la production d'anticorps agglutinants et la survie des poissons immunisés. La défaillance apparente de telles préparations immunogènes vient de la mauvaise identification des facteurs de virulence et de l'incorporation (inadéquate) de formes mal inactivées dans de tels vaccins.

Il est clair (cf. Pathogénie) que Aeromonas salmonicida produit des toxines. En effet, il a été mis en évidence une hémolysine (Karlsson, 1962), une protéase (Shieh et McLean, 1975) et une leucocidine (Klontz et al, 1966) extracellulaires. Récemment Bootsma (1980)

et Smith (1980) décrivent l'activité ichtyotoxique à la fois in vivo et in vitro de produits extracellulaires bruts de la bactérie. En revanche Paterson (1972) montre que des préparations d'endotoxine n'ont pas d'activité toxique pour les poissons. La virulence d'isolats est d'autre part considérée comme associée à la formation de colonies R et l'agglutination en culture liquide (Udey, 1978), mais la signification biochimique de ces observations reste obscure. On peut cependant admettre qu'à la libération d'un certain nombre d'agressines extracellulaires (protéases, leucocidines, hémolysines) est associée la capacité pour les bactéries d'adhérer ou de s'agglutiner sur un support.

La deuxième partie de ce travail tendra à démontrer l'action toxique d'un produit extracellulaire brut de Aeromonas salmonicida, isolé au Laboratoire Maritime du "Department of Agriculture and Fisheries for Scotland", à Aberdeen (Grande Bretagne) ; exotoxine qui semble être le facteur de virulence de la bactérie Aeromonas salmonicida, et à ce titre pourrait être à l'origine d'une nouvelle orientation dans la recherche d'un vaccin anti-furonculose.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DU ROLE PATHOGENE DE L'EXOTOXINE PRODUITE PAR AEROMONAS SALMONICIDA

Le but de cette étude est de déterminer la part exacte que prend le produit extracellulaire brut de Aeromonas salmonicida isolé au laboratoire maritime du D.A.F.S., dans la pathogénie de la maladie.

* Un certain nombre de publications (Esselmann et al. 1960 ; Karlsson, 1962, Shieh et al., 1975, Fuller et al, 1977) font état des activités lécithinasique, protéolytique, hémolytique ou leucocytolytique de substances analogues (isolées selon des procédés différents). Par analogie, au Laboratoire d'Ichtyopathologie du D.A.F.S. d'Aberdeen, nous avons adopté le protocole expérimental suivant :

- mise en évidence et dosage de l'activité lécithinasique de l'exotoxine par titration sur bouillon au jaune d'oeuf
- mise en évidence et dosage de l'activité protéolytique de l'exotoxine par titration de son activité caseinasique, et détermination de son activité protéolytique spécifique
- mise en évidence et dosage de l'activité hémolytique de l'exotoxine :

+ in vitro : titration de l'action de dilutions doubles d'exotoxine sur des hématies de lapin et des hématies de truite arc-en-ciel.

+ in vivo : dosage de l'hémoglobine plasmatique et sanguine après injection intra-péritonéale d'exotoxine.

- mise en évidence et essais de quantification de l'activité cytotoxique de l'exotoxine :

+ in vitro : action de dilutions d'exotoxine sur des cellules de truite arc-en-ciel (cultures de cellules RTG) et sur des leucocytes de truite arc-en-ciel (puis plus précisément sur des macrophages de même origine).

+ in vivo : mise en évidence de la toxicité de l'exotoxine vis-à-vis de la cellule musculaire, par dosage de l'aldolase et de la créatine phosphokinase sériques après injection de toxine.

* Il est d'autre part légitime de se demander si cette exotoxine peut reproduire seule (en l'absence de la bactérie) la maladie, et quel est son mécanisme d'action. Ces questions ont inspiré la mise en train des expérimentations suivantes :

- l'étude clinique et histopathologique de poissons ayant été préalablement inoculés par voie intra-musculaire ou par voie intra-péritonéale, avec différentes doses de toxine ;

- les mesures systématiques d'hématocrite après les injections d'exotoxine par voie intra-péritonéale ;
- les différents essais de mise en évidence (par neutralisation des activités hémolytique et protéolytique de l'exotoxine), de caractérisation (par immuno-électrophorèse), et de quantification de l'activité antitoxinique d'un facteur de défense aspécifique existant dans le serum d'animaux sains.

I - MATERIEL ET METHODES

A/ BACTERIOLOGIE

1/ Souches d'Aeromonas salmonicida disponibles

Le laboratoire maritime du D.A.F.S. possède huit souches d'origines diverses (Etats-Unis et Grande-Bretagne), dont deux isolées au laboratoire ; elles sont numérotées, de MT001 à MT008. Ces souches sont conservées sur milieu "Furonculose" chimiquement défini (Shieh et Reddy, 1972) et stockées à + 4°C et - 20°C.

2/ Milieux de culture

Outre les milieux classiquement utilisés (milieu nutritif Difco, milieu à la trypcase de soja Difco), nous avons été amenés à préparer les milieux suivants :

- milieu au jaune d'oeuf : 50 ml de jaune d'oeuf mélangés à 200 ml d'eau distillée sont chauffés à 45°C pendant 3h30. 60 ml du surnageant sont ensuite centrifugés (3000 tours/mn pendant 20 mn), filtrés à la trompe à vide et au filtre Millipore (0,22 microns) 20 ml de cette préparation sont ensuite mélangés à 100 ml de gélose nutritive (Difco), et versés dans des boites de Petri ; 20 ml sont ajoutés à 100 ml de bouillon nutritif (Difco) et versés dans des tubes.

- gélose à la gélatine : 19,2 grammes de Gélatine Nutritive Difco sont mélangés à 150 ml d'eau distillée et versés dans des tubes et des boites de Petri.

- gélose au lait écréme : du lait écrémé (5 grammes de poudre dilués dans 50 ml d'eau distillée) stérilisé (5 mn à 121°C) est mélangé dans la proportion de 12,5% à de la gélose nutritive (Difco) ; le mélange est stérilisé (15 mn à 121°C) et ramené à 50°C, puis versé dans des boites de Petri.

3/ Production, récolte et séparation de l'exotoxine par la technique de la feuille de cellophane

- Une boite de Petri contenant de la gelose nutritive (Difco) est ensemencée par une souche d'Aeromonas salmonicida et placée pendant 48 heures à 22°C.

- Une colonie bactérienne est prélevée et placée dans un récipient contenant 100 ml de bouillon à la trypcase de soja (Difco), placé dans un incubateur-agitateur, également pendant 48 heures à 22°C.

- 20 ml de cette culture sont ensuite prélevés centrifugés (3000 tours/mn pendant 15 mn), et le culot (constitué par les bactéries) séparé et mis en suspension dans 5 ml de soluté salé à 0,9% tamponné.
  Cette suspension est versée en chambre stérile sur un plateau d'émail (25 x 30 cm) stérilisé contenant 150 ml de gélose "Furonculose" ayant été recouvert e, après refroidissement, d'une feuille de cellophane également stérile. Le plateau ainsi ensemencé est conservé à 22°C pendant 48 heures.

- Puis 10 ml de soluté salé à 0,9 % sont versés sur la feuille de cellophane, et le liquide total (contenant bactéries et exotoxine) prélevé par raclage de la feuille de cellophane et pipetage.

- Pour séparer bactéries et exotoxine, on centrifuge trois fois à 3000 tours/mn pendant 30 mn à 4°C, et chaque fois on jette le culot. Puis on filtre le liquide sur Millipore (0,22 microns). L'exotoxine ainsi isolée est stockée à -20°C.

B/ POISSONS : INOCULATIONS, PRELEVEMENTS SANGUINS

Nous avons utilisé des truites arc-en-ciel (Salmo gairdneri) maintenues dans des bacs circulaires en fibre de verre de 2 mètres de diamètre alimentés par de l'eau courante à 15-16°C, nourries deux fois par jour avec des granulés pour truites du commerce.

Deux lots de poissons furent utilisés pour cette étude :
L'un, d'un poids moyen de 100 grammes environ (truites de l'année) = Lot I
L'autre, d'un poids moyen de 250 grammes environ (truites de deux ans) = Lot II

Les inoculations intra-péritonéales se firent juste à l'avant des nageoires pelviennes, l'aiguille étant maintenue oblique en direction de la queue; les inoculations intra-musculaires dans les muscles dorsaux.

Les prélèvements sanguins furent faits à la veine caudale (environ 0,5 ml par prélèvement).

Selon les essais envisagés, le sang était :

- Soit prélevé sur citrate de sodium (solution d'Alsever), et après quatre séries de lavage au soluté salé isotonique tamponné et centrifugations (1000 tours/mn, 10 mn, à 20°C), les hématies isolées.
- Soit prélevé sur héparine, et (dans la limite de 30 mn)
  . introduit par capillarité dans des microtubes à hématocrite qui après centrifugation (1000 tours/mn, 6 mn) étaient lus. 20 microlitres du plasma ainsi séparé des hématies (dans le microtube) pouvaient alors être utilisés pour la détermination du taux d'hémoglobine plasmatique.

. Pour la détermination du taux d'hémoglobine sanguin, 2o microlitres de ce sang étaient utilisés.

- Soit prélevé dans des tubes ne contenant pas d'anticoagulant : après coagulation (deux heures à la température ambiante),le serum était séparé du caillot et utilisé immédiatement ou stocké à - 20°C.

C/ CULTURES TISSULAIRES

Nous avons utilisé des cellules RTG-2 (Rainbow Trout Gonad = Fibroblastes), d'origine américaine (CCL-55). L'amplitude de température supportable par ces cellules est de 4 à 24°C, l'optimum se situant à 20°C. Ces cellules sont conservées à 4°C dans du milieu d'entretien composé comme suit :

86 % d'eau bidistillée
9,5% de milieu de Eagles concentré (x10)
1% de L-Glutamine
3,5% de solution de $NaHCO_3$ à 7,5%

additionné de 2% de serum d'embryon de bovin.

Pour utiliser ces cellules, on procède comme suit :

- Incubation d'une nuit à 20°C
- Répartition en flacons plats de 25 cm2 (environ 10^6 cellules par flacon)
- Croissance confluante (monocouche cellulaire) en milieu de croissance (5 ml) : milieu d'entretien additionné de 10 % de serum d'embryon de bovin et de 1% de Kanamycine.

D/ LEUCOCYTES

1) Adaptation de la méthode de Bøyum (1968) décrite par Sigma (Histopaque 1077)

- 7,5 ml de milieu de croissance sont additionnés à 2,5 ml de sang(prélevé sur héparine)
- 5 ml de ce mélange sont posés sur Sigma Histopaque dilué au 1/10.
- après centrifugation à 400 g (2000 tours/mn) pendant 30 mn exactement, le surnageant est éliminé, l'interface opaque (contenant les leucocytes) est transféré et mélangé à trois fois son volume de milieu de croissance.
- on réalise une nouvelle centrifugation (à 200 g pendant 10 mn exactement),le surnageant est éliminé, et le culot resuspendu dans 10 ml de milieu de croissance, et l'opération précédente est renouvelée.
- le culot est alors resuspendu dans 1 ml de milieu de croissance et les essais de richesse en leucocytes et de viabilité des cellules au trypan bleu (lecture à l'hémocytomètre sous microscope) sont réalisés.
- Les leucocytes ainsi obtenus doivent être utilisés rapidement.

2) Séparation et cultures de macrophages

La préparation leucocytaire est mise en suspension dans du milieu de croissance et versée dans une boite de Petri de 90 mm contenant des lamelles de 10 mm de verre dégraissé et non siliconé. Après deux heures, les lamelles sont enlevées à la pince et lavées par deux fois dans du milieu de croissance pour éliminer les cellules non adhérentes. Ce procédé permet de récolter 50 lamelles portant chacune cinq à dix macrophages mobiles.

E/ IMMUNOELECTROPHORESE

On a utilisé des bandes d'acétate de cellulose (Cellogel, Whatman Ltd) dans une solution tampon de diethylmalonylurée sodée à 0,04 M (pH 9,25), à température ambiante, sous un courant continu de 200 volts pendant 30 mn. Coloration au nigrosine à 0,005 % dans l'acide acétique à 5%.

F/ MATERIEL DE LABORATOIRE

Toutes les lectures d'absorption colorimétrique furent faites sur le spectrophotomètre ultraviolet Pye Unicam SP 1800. Les coupes histologiques réalisées au microtome après inclusion en paraffine, furent colorées à l'hémateine-éosine.

La microphotographie est due à un appareil photographique Nikon associé à un microscope Zeiss de grossissement oculaire 12,5.

II - RESULTATS

§ Effets de l'exotoxine in vitro

A/ ACTIVITE LECITHINASIQUE

1/ Culture en bouillon et sur gelose au jaune d'oeuf

Nous avons testé les huit souches d'Aeromonas salmonicida disponibles, et comme témoin positif une culture de Bacillus cereus, sur de la gelose au jaune d'oeuf en boîtes de Petri et du bouillon au jaune d'oeuf en tubes.

Les résultats sont lus 72 heures après ensemencement :

- dans les boites de Petri, de larges zones d'opalescence autour des colonies
- dans les tubes, un anneau jaune de surface

2/ Test quantitatif : titration de l'activité lécithinasique des exotoxines de cinq souches d'Aeromonas salmonicida

Du bouillon au jaune d'oeuf est exposé à des dilutions doubles d'exotoxine (dans du soluté salé à 0,9% tamponné).

Les résultats sont lus après 72 heures

Dilutions		1	1/2	1/4	1/8	1/16	Témoins sans exotoxine
Exotoxine	MT001	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-
	5	+	+	-	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-

(+ = présence d'un anneau en surface)

B/ ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

1/ Tests qualitatifs

Nous avons testé 7 souches d'Aeromonas salmonicida (MT001-2-3-4-5-6-7) et comme témoin positif une culture de Bacillus cereus

a/ Culture sur gélose à la gélatine en boites de Petri et tubes

Les résultats sont lus 72 heures après ensemencement :

- dans les boites de Petri, une très importante liquéfaction de la gélatine autour des colonies
- dans les tubes, les colonies ont pénétré plus avant dans le milieu, la partie supérieure de celui-ci étant liquéfiée.

b/ Culture sur gelose au lait écrémé en boites de Petri.

Soixante-douze heures après ensemencement, on constate, autour des colonies, des zones de clarification indiquant une activité caseinasique de toutes les souches d'Aeromonas salmonicida testées

2/ Titration de l'activité protéolytique de l'exotoxine ; activité protéolytique spécifique de l'exotoxine de la souche MT004.

Méthode de McDonald & Chen (1965)

Absorptions lues après une heure, à 655 nanomètres :

Exotoxine 1 : 0,112
2 : 0,099
4 : 0,109
5 : 0,086
6 : 0,115

Traduction en unités d'activité enzymatique /ml :

Exotoxine 1 : 11,2 U/ml
2 : 9,9 U/ml
4 : 10,9 U/ml
5 : 8,6 U/ml
6 : 11,5 U/ml

En utilisant le calcul du taux protéique total de l'exotoxine de la souche MT004 (cf. Annexe page 106 ; on peut déterminer l'activité protéolytique spécifique de cette exotoxine : 10,9/4,6 = 2,4 U/mg

C/ ACTIVITE HEMOLYTIQUE

1/ Sur hématies de lapin

Les hématies de lapin sont obtenues après prélèvement sanguin à la veine auriculaire sur solution d'Alsever (citrate de sodium + soluté salé isotonique tamponné). Ces hématies, diluées au 1/100 dans du soluté salé isotonique tamponné, sont soumises à des dilutions doubles d'exotoxine (à volumes égaux).

Après une heure à 22°C, on n'observe pas d'hémolyse, mais une agglutination : après 24 heures, on observe pour toutes les exotoxines testées une hémolyse d'intensité variable (les résultats sont indiqués dans le tableau de la page suivante).

	Dilutions	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
ès 1h	Exotox. 1	A	A	A	A	A	S	S	S	S
	2	A	A	A	A	A	A	S	S	S
	4	A	A	A	A	A	S	S	S	S
	5	A	A	A	S	S	S	S	S	S
	6	A	A	A	A	A	A	S	S	S
ès 24h	Exotox. 1	H	H	H	H	H	H	H	HS	S
	2	H	H	H	H	H	H	H	H	S
	4	H	H	H	H	H	H	H	HS	S
	5	H	A	A	A	A	A	S	S	S
	6	H	H	H	H	H	H	H	HS	S

H = hémolyse
S = sédimentation
A = agglutination
HS = hémolyse en cours

2) Sur hématies de truite arc-en-ciel
Même technique
Résultats:

	Dilutions	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
rès 30 mn à 22°C	1	H	H	H	H	H	H	HS	HS	S
	2	H	H	H	H	H	H	HS	HS	S
	4	H	H	H	H	H	H	HS	HS	S
	5	H	H	H	H	HS	HS	S	S	S
	6	H	H	H	H	H	H	H	HS	S
rès 1 heure à 22°C	1	H	H	H	H	H	H	H	HS	S
	2	H	H	H	H	H	H	H	HS	S
	4	H	H	H	H	H	H	H	HS	HS
	5	H	H	H	H	H	HS	S	S	S
	6	H	H	H	H	H	H	H	HS	HS

L'hémolyse est ici beaucoup plus rapide et plus intense que dans le cas précédent.

D/ ACTIVITE CYTOTOXIQUE ET CYTOLYTIQUE

Nous avons utilisé dans les expérimentations suivantes l'exotoxine de la souche MTOO4

1/ Action de l'exotoxine sur les cultures cellulaires (RTG-2)

a/ Exposition de cultures cellulaires à des concentrations décroissantes d'exotoxine pendant une période donnée (15 mn)

Dans cinq flacons de 25 cm2 de surface de base, on introduit 0,5 ml des solutions d'exotoxine, et dans un sixième flacon (témoin) 0,5 ml de soluté salé à 0,9% tamponné. Après 15 mn, on enlève ces solutions et on lave les cellules au milieu d'entretien (5 ml par flacon). Puis on décolle les cellules à la trypsine-EDTA (0,5ml) dont l'action est arrêtée au bout de 2 mn par 0,5 ml de milieu de croissance.

Après coloration au trypan bleu à 0,1% on compte les cellules à l'hémocytomètre :

Concentration	Cellules vivantes	Cellules colorées (mortes)
1	1	1 Très nombreux
10^{-1}	26	11 amas de débris
10^{-2}	80	4 cellulaire
10^{-3}	115	2
10^{-4}	136	1
Témoin	121	2

Ces résultats montrent :

- qu'au contact de l'exotoxine non diluée, la quasi-totalité des cellules est lysée au bout de 15 mn ;
- que cet effet de lyse est très atténué aux dilutions supérieures, pour lesquelles on constate une contraction des cellules qui prennent une forme polygonale, laissant entre elles des espaces vides d'autant moins importants que la dilution est élevée. Certaines cellules, dont le nombre diminue quand la dilution augmente, sont complètement arrondies et leur cytoplasme très réduit (ces cellules, qui fixent le trypan bleu, sont mortes).
- qu'à la concentation 10^{-3}, l'effet de l'exotoxine est à peu près invisible.

b/ Exposition de cultures cellulaires à une concentration donnée (10^{-2}) d'exotoxine pendant des périodes croissantes.

Dans huit flacons de 25 cm2 de surface de base on introduit 0,5 ml d'exotoxine à la concentration 10^{-2}

Dans un neuvième et un dixième flacons (témoins) on introduit respectivement 0,5 ml de soluté salé isotonique tamponné et 0,5 ml de milieu d'entretien.

A des périodes de temps données, on enlève les solutions d'exotoxine, et on rince au soluté salé (1 ml) Puis on ajoute 0,5 ml de trypan bleu à 0,1%, et on compte les cellules à l'hémocytomètre :

Temps	Cellules vivantes	Cellules contractées	Cellules mortes (colorées)
10 mn	98 %		
15 mn	95%	25-30%	
20 mn		50%	
45 mn		80%	
60 mn		90-95%	
120 mn			50-60% des ℄ non lysées
4 h			lyse 100%
24 h			lyse 100%

Les pourcentages sont évalués par comptage de 100 cellules. Les flacons ont été maintenus à une température constante de 15°C.

Ces résultats montrent les différentes étapes de l'action cytotoxique de l'exotoxine :

- contraction cellulaire dans un premier temps
- lyse cellulaire, totale au bout de quatre heures pour la concentration étudiée (dans les flacons correspondant aux temps h4 et h24, les débris cellulaires sont décollés du fond et flottent dans le liquide, où ils forment des agrégats colorés par le trypan bleu).

/

2/ Action de l'exotoxine sur les leucocytes

a/ Leucocytes soumis à des dilutions doubles d'exotoxine.

Des leucocytes, maintenus dans du milieu d'entretien, sont disposés dans 11 rangées de 12 logettes d'une boite à microtitration (environ 10^5 leucocytes par logette) et laissés quelques heures à sédimenter. Puis ils sont exposés à des dilutions doubles d'exotoxine :
5 rangées (duplicata) : concentration 1/2 à 1/4096
5 autres rangées (duplicata) : concentration 1/200 à 1/25600.

Dans les logettes de la onzième rangée (témoin) on met 100 microlitres de milieu d'entretien.

Après cinq heures à 15°C on expose les cellules au trypan bleu.

Tableau des résultats

Concentration	Cellules mortes	Cellules vivantes arrondies	Cellules à pseudo-podes	% Cellules vivantes	% ♀ à pseudo-podes / ♀ arrondies
1/1	Cyto-				
1/4					
1/8	lyse				
1/16					
1/32	100%				
1/64		2%	0	2%	
1/128		11%	1%	11%	
1/256		18%	1%	18%	
1/512		30%	1%	31%	3,3%
1/1024		62%	6%	68%	9,7%
1/2048		71%	7%	78%	9,8%
1/4096		81%	8%	89%	9,9%
1/200		12%	1%	12%	
1/400		23%	1%	24%	4,3%
1/800		42%	5%	47%	11,9%
1/1600		69%	7%	76%	10,1%
1/3200		75%	7%	82%	9,3%
1/6400		83%	9%	92%	10,8%
1/12800		80%	8%	88%	10,%
1/25600		81%	9%	90%	11,1%
témoin		82%	9%	91%	11 %

Les pourcentages sont évalués par comptage de 200 cellules dans chaque logette, et calcul de la moyenne des cinq duplicata.

Les cellules à pseudopodes sont des macrophages (dont la proportion normale par rapport aux lymphocytes est comprise entre 7 et 12%).

Les cellules arrondies sont :
soit des lymphocytes
soit des macrophages dont les pseudopodes sont rétractés.

Le tableau des résultats met en évidence les points suivants :

- au delà d'une concentration comprise entre 1/3200 et 1/4096, les effets de l'exotoxine sur les leucocytes sont inapparents.
- aux concentrations comprises entre 1/3200 et 1/800, la lyse cellulaire est homogène, les macrophages à pseudopodes se trouvant en proportion normale par rapport aux cellules arrondies.
- pour une concentration comprise entre 1/800 et 1/512, le taux de cellules à pseudopodes subit une chute brutale, qui peut signifier:
  . soit qu'en deçà de cette concentration d'exotoxine les macrophages sont l'objet d'une destruction sélective
  . soit que ces macrophages subissent une modification cellulaire (par rétraction de leurs pseudopodes) due à la cytotoxicité de l'exotoxine

- aux concentrations supérieures à 1/64, l'exotoxine provoque la lyse de toutes les cellules de la lignée blanche.

b/ Macrophages soumis à des dilutions doubles d'exotoxine.

Les lamelles porteuses de macrophages sont rincées et placées par quatre dans dix boites de Petri (12 x 30 mm) contenant 2 ml de milieu d'entretien ; 2 ml de dilutions doubles d'exotoxine sont ajoutés dans chaque boite. Une onzième boite de Petri contenant également quatre lamelles et 2 ml de milieu d'entretien sert de témoin. Les résultats sont lus après deux heures à 15°C.

Concentrations	Macrophages
1/10	Lyse 100 %
1/20	" "
1/40	" "
1/80	Lyse 90%
1/160	" "
1/320	Lyse 80% (cellules restantes arrondies)
1/640	Rétraction des pseudopodes (60-70% de ¢ arrondies
1/1280	Début de rétraction des pseudopodes
1/2560	Pas d'effet notoire (qq ¢ arrondies)
1/5120	" " "
Témoin	Quelques cellules arrondies

c/ Interprétation

Sur les leucocytes, l'exotoxine a un effet :

- cytotoxique aux faibles concentrations : rétraction des pseudopodes des macrophages, arrondissement cellulaire ;
- cytolytique aux fortes concentrations.

§§ Effets de l'exotoxine in vivo

Pour toutes les expérimentations suivantes, nous n'avons utilisé que l'exotoxine de la souche MT004

A/ EFFET LETAL

1/ Dix poissons du lot I reçurent par voie intra-péritonéale 0,3 ml d'exotoxine (ce qui correspondrait, selon les calculs d'équivalence donnés en Annexe page 107 à environ $1,75 \times 10^9$ bactéries) et cinq autres poissons-témoins 0,3 ml de soluté salé isotonique tamponné.

Après 24 heures, 8 des 10 poissons-tests étaient morts, les 5 du groupe témoin ne semblant pas avoir souffert de l'injection.

2/ Six poissons du lot II reçurent par voie intra-péritonéale les doses suivantes d'exotoxine :
- 2 poissons A reçurent 1 ml
- 2 poissons B reçurent 0,75 ml
- 2 poissons C reçurent 0,5 ml.

Après 24 heures, les 2 poissons A et l'un des poissons B étaient morts.

B/ SYMPTOMES ET LESIONS

1/ Injection par voie intra-péritonéale

a/ Symptômes

L'injection d'une dose importante d'exotoxine entraîne la mort des poissons en 3 à 4 heures, sans signes cliniques.

Six à dix heures après injection d'une dose moindre, les poissons sont de couleur sombre, cessent de s'alimenter et adoptent une nage ébrieuse, en surface, les mouvements de leurs opercules sont irréguliers. La mort survient dans les 24 à 36 heures.

b/ Lésions

α) Autopsie

La cavité générale apparait pleine d'un liquide hémorragique, et des pétéchies sont observées sur la paroi abdominale et à la surface de la plupart des viscères ; la rate est hypertrophiée, rouge-cerise et brillante; le foie est congestionné et marbré ; le rein est très congestionné ; rectum et anus sont enflammés, parfois des adhérences entre organes sont observées.

β) Histopathologie

- La rate est congestionnée; les parois des ellipsoïdes sont dégénérées ; dans certains cas il y a accumulation importante de lymphocytes autour de ces ellipsoïdes, à certains endroits, on voit des plages d'hémosidérine.

- Au niveau du rein on observe un léger début de nécrose du tissu hématopoïétique ; on note la présence de nombreux lymphocytes et de quelques eosinophiles. Le tissu excréteur ne semble pas modifié.

- Foie : quelques petites hémorragies sont visibles, mais les lésions restent limitées.

- Coeur : l'épicardite ventriculaire est sévère dans certains cas ; le péricarde est envahi de cellules sanguines ; le myocarde est peu endommagé ; parfois existent des thrombus dans la cavité ventriculaire et dans la lumière des vaisseaux coronaires.

- Branchies : il y a infiltration lymphocytaire et éosinophilique dans l'épithélium à la base des filaments branchiaux.

- Intestin : on note une vasodilatation plus ou moins marquée (selon les poissons) des vaisseaux de la lamina propria de la muscularis mucosae et de la séreuse; ainsi que la présence de nombreux éosinophiles dispersés dans la lamina propria, mais aussi de cellules au noyau excentré et cytoplasme rose-grisâtre qui peuvent être des éosinophiles dégranulés (ce que semble confirmer la présence de nombreux granules éosinophiliques libres).

2/ Injection par voie intra-musculaire

a/ Symptômes

Après quelques heures, des boursoufflures apparaissent aux points d'injection; ces "abcès" s'ulcèrent après 36 à 48 heures.

b/ Lésions

α) Autopsie

A la section, les "abcès" apparaissent remplis d'un liquide visqueux hémorragique, et s'étendent très profondément dans les plans musculaires.

A l'ouverture de la cavité générale, le foie apparaît anormalement pâle.

β) Histopathologie

- Le muscle subit une liquéfaction totale (fluide rose opaque) ; la nécrose liquéfactive s'étend aux myomères environnants à travers les myosepta, où l'hémorragie et l'infiltration leucocytaire sont très importantes.

- Tégument : le tissu adipeux de l'hypoderme est nécrosé, le stratum compactum du derme est détruit par endroits.

- Foie : on note la présence de nombreux lymphocytes au voisinage des vaisseaux sanguins, des hépatocytes nécrosés apparaissent par endroits.

- Tubules rénaux : dans quelques cas, il y a accumulation de gouttelettes hyalines dans les cellules épithéliales.

C/ MODIFICATIONS DES PROPRIETES ET DE LA COMPOSITION DU SANG

1/ Hématocrite

a/ Expériences et résultats

- 10 poissons du lot I

		Moyennes
h0	Hématocrites : 52-51-49-46-48-51-48-45-48-45 0,5 ml d'exotoxine par voie IP	48,3
h5	hématocrites : 24-29-31-27-38-18-33-33-35-33	30,1

A ces résultats fut appliqué le test U de Mann & Whitney, qui indique une chute des hématocrites significative au seuil de 0,1%

- 5 poissons du lot I

		Moyennes
h0	hématocrites : 52-47-41-51-49 0,5 ml de NaCl 0,9 % tamponné par voie IP	48
h5	hématocrites : 35-29-36-28-32	32

Le test U indique ici une chute significative au seuil de 0,4%

- 10 poissons-tests du lot I
  6 poissons-témoins du lot I

poissons inoculés à h0	Hématocrites à h15	Moyennes
Tests (0,1ml d'exo).	51-42-45-46-44-42-47-50-36-39	44,2
Témoins (0,1ml NaCl)	44-36-44-52-49-51	46

Le test U indique une différence non significative entre ces deux séries de mesures

- 10 poissons-tests
  6 poissons-témoins du lot II reçurent 0,3 ml exot. / 0,3 ml Nacl

	h24	h52	h80	j6	j6+24h
Tests	47	42	23	reçurent	31
	28	35	41	0,45 ml	32
	39	24	27	d'exotoxine	18
	31	26	34		32
	33	27	16		20
	39	26	22		17
	40	23	35		37
	41	34	19		30
	41	26	22		35
	38				
moyennes	37,7	29,2	26,5		28

.../...

	h24	* h52	h80	j6	j6+24h
témoins	45 49 37 40 41 38	38 29 32 35 28	39 16 29 19 31	reçurent 0,45 ml de NaCl 0,9% tamponné	40 23 20 37 10
moyennes	41,7	32,4	26,8		26
Tests U	non sign.	non sign	non sign		non signific.

* mort d'un poisson dans chaque groupe entre h24 et h52.

b/ Interprétation

L'ensemble de ces résultats permet de dire que l'injection intra-péritonéale d'exotoxine fait chuter très rapidement l'hématocrite. Cependant il semble que n'importe quelle injection (de solution saline isotonique, par exemple) ait un effet similaire. Cette chute serait donc due plutôt au stress subi par les animaux qu'à l'action de l'exotoxine elle-même. En observant d'ailleurs l'évolution des moyennes des hématocrites dans chaque groupe, on s'aperçoit qu'en règle générale elles diminuent quand le nombre de manipulations (et donc le stress) augmente.

2/ Hémolyse

La titration de l'hémoglobine du plasma et du sang fut réalisée par la méthode de la cyanméthémoglobine. Absorptions lues à 540 nm.

Les valeurs données dans les tableaux de résultats sont exprimées en g/100 ml, et sont obtenues de la façon suivante :

Absorption de la solution standard (équivalent de 0,3 g de Hb/100 ml de sang) = 0,104

Facteur de dilution = 201

On a : taux d'Hb (en g/100 ml) = $\frac{A^{540}}{0,104} \times \frac{3 \times 201}{1000}$

a/ Dosage de l'hémoglobine plasmatique après injection intra péritonéale d'exotoxine

- 10 poissons-tests
  6 poissons-témoins
  } du lot I reçurent { 0,5 ml exot. / 0,5 ml Nacl.

	h0	h5	Tests U
tests	0,116	0,406	Significatif au seuil de 0,1%
	0,127	0,261	
	0,052	1,090	
	0,012	0,504	
	0,127	0,325	
	0,110	0,626	
	0,069	0,783	
	0,081	0,522	
	0,064	0,400	
	0,122	0,591	
moyennes	0,088	0,551	
témoins	0,029	0,011	non signific.
	0,122	0,023	
	0,023	0,041	
	0,081	0,046	
	0,011	0,197	
	0,023	0,069	
moyennes	0,048	0,064	
Test U		Significatif au seuil de 0,1%	

- 10 poissons tests
  6 poissons témoins
} du lot I reçurent {0,1 ml exot.
0,1 ml NaCl

	Tests	Témoins	Test U
résultats à h15	0,197 0,069 0,052 0,035 0,127 0,093 0,023 0,058 0,116 0,081	0,075 0,122 0,098 0,023 0,093 0,035	non significatif
moyennes	0,085	0,074	

d/ Dosage de l'hémoglobine sanguine après injection intra-péritonéale d'exotoxine

- 10 poissons du lot I reçurent par voie IP 0,3ml d'exotoxine. Cependant 8 d'entre eux étaient morts 24 heures plus tard, et l'expérience ne put donc être poursuivie. Un prélèvement sanguin avant inoculation a permis tout de même d'avoir une idée des valeurs normales du taux d'hémoglobine sanguine des truites de cet âge : 1,681;2,168;2,319;2,087;2,493;1,160;2,348;1,565;2,029; 2,348

Moyenne = 2,020g/100 ml

Cette valeur moyenne semble faible par rapport à celles citées dans la littérature (Wedemeyer et Yasutake donnent des taux s'étendant entre 5,4 et 9,3 g/100 ml).

- 10 poissons-tests
  6 poissons-témoins
  du lot II reçurent { 0,3 ml exot. / 0,3 ml Nacl.

	h24 *	h52	h80	j6	j6+24h	Test Anova de Friedmann
Tests	2,041 1,420 2,522 1,322 2,354 1,252 2,273 2,186 2,453 2,110	1,496 2,563 1,299 2,302 1,339 2,163 2,105 2,261 2,174	1,606 2,551 1,519 2,371 1,455 2,226 2,151 2,441 2,395	reçurent 0,45 ml d'exotox	1,449 2,476 1,316 2,279 1,276 2,058 2,087 2,348 2,203	significatif au seuil de 2%
moyennes	1,993	1,967	2,079		1,943	
témoins	2,128 1,809 2,737 2,047 2,980 2,273	2,087 1,589 2,731 1,983 2,876	2,047 1,606 2,795 2,116 2,945	reçurent 0,45 ml de NaCl 0,9 %	2,070 1,681 2,754 2,006 2,928	non significatif
moyennes	2,329	2,253	2,302		2,288	
Tests U	non signif.	non signif.	non signif.		non signif.	

* mort d'un poisson de chaque groupe entre h24 et h52.

c/ Interprétation

L'ensemble des résultats relatifs à la titration de l'hémoglobine suggère les réflexions suivantes :

- Une importante hémolyse suit très rapidement une injection intra-péritonéale de toxine. Cependant, après une quinzaine d'heures, on ne trouve à peu près plus trace d'hémoglobine dans le plasma, ce qui semble indiquer le captage par le foie et la rate des molécules d'hémoglobine libres.

- Cette hémolyse laisse un déficit sanguin en hémoglobine qui atteint son maximum entre 24 et 80 heures (ce qui indique que l'activité hémolytique de la toxine se manifeste encore après 24 Heures). Puis l'organisme récupère lentement. Une nouvelle injection provoque une nouvelle chute du taux sanguin d'hémoglobine.

3/ Enzymes sériques

a/ Aldolase

Détermination colorimétrique
Absorptions lues à 540 nm
Utilisation de la courbe standard (cf Annexe page 111)
Valeurs indiquées en Unités Sigma /ml de sérum.

- Valeurs normales : H.S. Shieh (1976) donne pour le saumon de fontaine (Salvelinus fontinalis) des valeurs normales situées entre 56 et 150 Unités Sigma/ml
moyenne = 95 Unités/ml écart-type = 14

-10 poissons tests
6 poissons témoins
} du lot I reçurent par voie IP
{0,1 ml de toxine
{0,1 ml de NaCl 0,9%

Résultats à h15

	Tests	Témoins	Test U
	52,8 32,4 23,6 43 37,5 28,8 45,4 59,5 37,8	42 31,5 27,6 39 55	Non significatif
Moyennes	40,7	37,9	

- 10 poissons-tests
  6 poissons-témoins
  } du lot II reçurent par voie IP { 0,3ml d'exotoxine / 0,3 ml de NaCl 0,9%

	h24 *	h52	Test de Wilcoxon	h80
Tests	84,6 26 31,6 56,2 33 56,2 65,4 27,5 33,4 97,4	25,5 30 49,7 28,5 49,8 56,2 29,5 35,1 71	non signific.	données inutilisables (sang très hémolysé au moment de la séparation du sérum)
Moyennes	51,1	41,7		
témoins	31,5 35 41,5 65,4 27,5 38	32 45,6 77,2 29,2 35,5	non signific.	
Moyennes	39,8	43,9		
Tests U	Non sign.	Non sign.		

* Mort d'un poisson de chaque groupe entre h24 et h 52.

b/ CPK (Créatine Phosphokinase)

Détermination colorimétrique
Absorptions lues à 540 nm
Utilisation de la courbe standard (cf. Annexe page 112)

Les valeurs sont indiquées en Unités Sigma /ml de sérum.

- Valeurs normales : H.S. Shieh (1976) donne pour l'omble de fontaine (Salvelinus fontinalis) des valeurs normales situées entre 45 et 110 Unités Sigma/ml
moyenne = 60 Unités/ml
écart-type = 9

- 10 poissons-tests } du lot I reçurent par voie IP { 0,1ml de toxine
  6 poissons-témoins } { 0,1ml de NaCl 0,9%

Résultats à h15

	Tests	Témoins	Test U
	48		
	28,5	52,5	
	67,5	22	
	66,5	12,5	Non
	16,5	56	signific.
	47	15,5	
	29	34,5	
	34,5		
	38,8		
	33		
moyennes	40,9	32,2	

- 10 poissons-tests
  6 poissons-témoins
  du Lot II reçurent par voie IP
  0,3 ml d'exotoxine
  0,3 ml de NaCl 0,9%

	h24 *	h52	h80	Test Anova de Friedmann
Tests	70	25,9	27,2	Significatif au seuil de 5%
	72,5	30	36,5	
	280	116,5	125,5	
	158	72,2	74	
	386,5	140	138	
	158	106,5	98,6	
	129	75,7	61	
	544,5	202,2	190	
	98,5	44,5	52	
	492,6			
Moyennes	205,0	90,4	89,2	
Témoins	81,5			Non Significatif
	210	167,5	192	
	61	54,5	69	
	77,5	80,5	80	
	44,5	39	45,5	
	71,5	66	70,5	
Moyennes	91	81,5	91,4	
Tests U	Signif. au seuil de 2,5%	Non Signif.	Non Signif.	

* mort d'un poisson de chaque groupe et entre h 24 et h 52.

c/ Interprétation

L'ensemble des résultats relatifs aux taux d'aldolase et de CPK sériques amène les réflexions suivantes :

- Pour chacune de ces enzymes, les valeurs moyennes trouvées ici sont nettement inférieures à celles citées dans la littérature ;
- Les tests statistiques n'indiquent pas de modification significative dans les taux d'aldolase sérique ; cependant on peut déceler une légère tendance à l'accroissement de ces taux à la vingt-quatrième heure après inoculation, accroissement fugace (à h52, poissons-tests et témoins ont des taux équivalents). Mais les données sont insuffisantes pour autoriser une déduction quelconque;

- Les taux de CPK sérique augmentent de façon significative entre h15 et h24 après inoculation, pour diminuer ensuite relativement rapidement (àh52, ils sont de même ordre pour les poissons-tests et les témoins).
  La créatine phosphokinase se trouve normalement en forte concentration dans les cellules musculaires (cf. Gaudet, Racicot et Leary, 1975). Il existe donc une corrélation entre une élévation de la concentration sérique de CPK et le degré de dommage musculaire.
  La concentration d'aldolase sérique, en cas de lésion musculaire, devrait croître également. Mais rappelons qu'ici les poissons ont subi une inoculation intra-péritonéale, et donc le dommage musculaire, certes présent, reste limité.

§§§ Le Facteur Sérique de Défense Aspécifique

A/ MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION IN VITRO

1/ Neutralisation de l'activité hémolytique de l'exotoxine par des sérums d'animaux sains

a/ Technique : modification du test de titration de l'activité hémolytique de l'exotoxine in vitro

Schéma de la manipulation:

Tubes	1	2	3	4	....	11	12
NaCl	100µl	100µl	100µl	100µl		100	100µl
Exot.	100µl	100µl	100µl	100µl		100	*
Sérum	50µl	50µl	50µl	50µl		50µl	
Hématies diluées 1/100	100µl	100µl	100µl	100µl		100µl	100µl

*100µl jetés

Les sérums utilisés sont préalablement dilués au 1/12 et chauffés à 45°C pendant 20 mn.
Rangée de contrôle (témoin) : sans serum
Les lectures sont faites après une heure
Titre = titre de la première logette où l'hémolyse est incomplète (dans le cas où plusieurs logettes successives présentent des hémolyses en cours, titre = moyenne de leurs titres).

b/ Expérience et résultats : effet de serums de poissons et lapin sur le titre hémolytique d'hématies de truite arc-en-ciel lavées à l'exotoxine.

Contenance des logettes	Titres d'agglutinines anti-A.s des sérums	Dilution double d'exot. donnant l'hémolyse	Titre
hématies+exot		1/256	256
hématies+ exot. + serum de tr. arc en ciel	<1/2	1/12	12
hématies+exot. + serum de saumon atlantique	<1/2	1/12	12
hématies+exot. +serum de tr. brune europ.	<1/2	1/32	32
hématies+exot. + serum de lapin	<1/2	1/128	128

c/ Interprétation

Le titre d'agglutinines anti-Aeromonas salmonicida de ces quatre sérums est très bas (inférieur à 1/2) Il s'agit donc d'animaux sains.

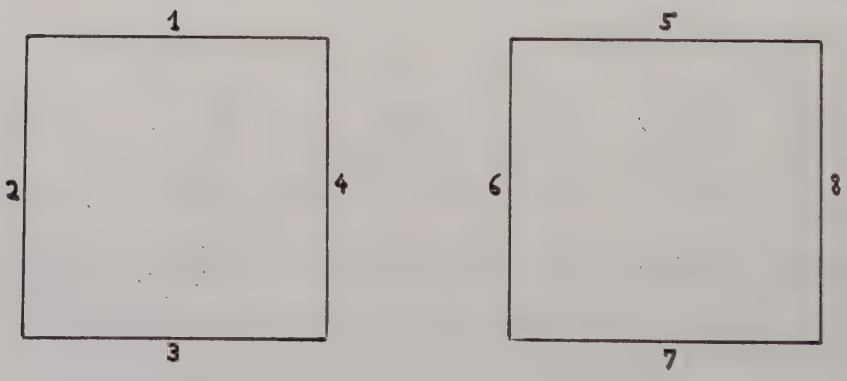
Une considérable dépression de l'activité hémolytique de l'exotoxine est notée, au contact des serums des trois espèces de Salmonidés. Cette dépression est moindre avec le sérum de lapin.

2/ Neutralisation de l'activité protéolytique de l'exotoxine par le serum de truite arc-en-ciel saine

a/ Technique

Des tests de diffusion utilisant une gélose au lait écrémé furent appliqués pour montrer que le sérum de truite arc-en-ciel saine inactive la protéase de l'exotoxine et la trypsine.

b/ Expérience et résultats



1 : Exotoxine
2 : Trypsine
3 : 1 vol. exotox.+1 vol.serum
4 : 1 vol. trypsine+ 1 vol. serum
5 : 1 vol. exotox. + 4 vol. serum
6 : 1 vol. exotox. + 5 vol. serum
7 : 1 vol. exotox. + 7 vol. serum
8 : 1 vol. exotox. + 8 vol. serum.

L'exotoxine produit un anneau opaque de diffusion. Mais quand il y a activité caseinasique, une zone de protéolyse marginale peut être observée à la limite de cette zone opaque. Le serum non dilué inactive complètement (plus de protéolyse marginale) une dilution au 1/7 d'exotoxine.

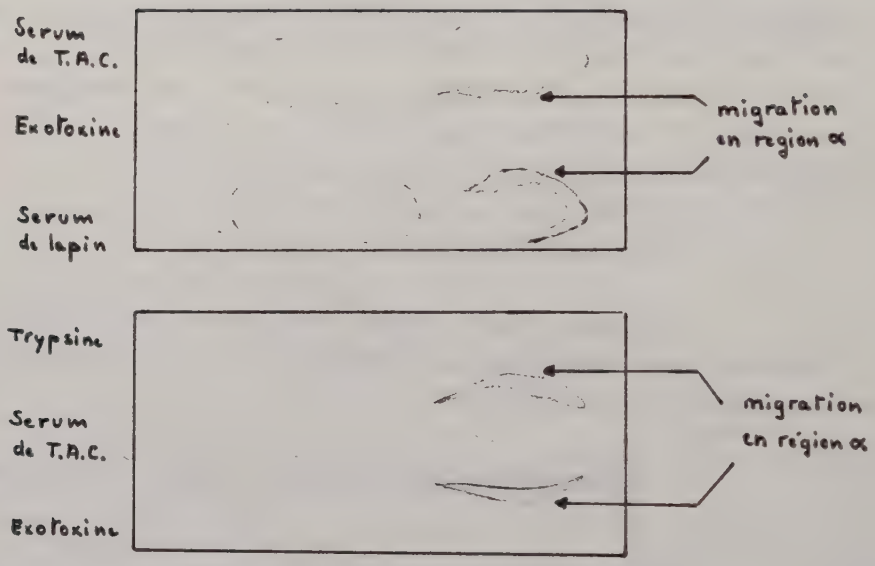
c/ Interprétation

Le serum d'une truite arc-en-ciel saine (titre d'agglutinines très faible : inférieur à 1/2) contrecarre l'activité protéolytique de l'exotoxine.

3/ Immuno-électrophorèse (cf Munro et al, 1980)

Les tests suivants sont réalisés :

- diffusion contre l'exotoxine (en gouttière centrale) de serums de truite arc-en-ciel et de lapin
- diffusion contre l'exotoxine et une solution de trypsine (dans les gouttières latérales) de serum de truite arc-en-ciel.



Les serums d'une truite arc-en-ciel saine et de lapin, quand ils diffusent contre l'exotoxine, produisent une précipitine en région α- rapide.

Le sérum d'une truite arc-en-ciel saine produit une précipitine presque identique contre l'exotoxine et la trypsine, en région αmigrante.

Les précipités ne sont pas solubles dans le citrate ou l'Ethylène Diamine Tétraacétique (Baldo & Fletcher, 1973).

B/ ROLE DE PROTECTION CONTRE L'EXOTOXINE IN VIVO

1/ Expérience et résultats

Des groupes de 5 ou 6 truitelles arc-en-ciel pesant chacune $17^{+}_{-}7$g furent inoculées par voie intra-péritonéale avec 0,05 ml d'exotoxine diluée au 1/10 ou au 1/15 en soluté salé tamponné (c'est-à-dire 0,50 ou 0,75 ml par injection). Tous moururent en 24 heures.

Dans le but de déterminer si un sérum normal peut protéger les poissons contre l'exotoxine, l'expérience fut recommencée en diluant cette fois l'exotoxine au 1/10 ou au 1/15 dans du serum de truites arc-en-ciel saines du lot I et en laissant incuber ce mélange pendant 30 mn à température ambiante.

Des groupes de poissons témoins reçurent des doses équivalentes de soluté salé tamponné ou de serum sans exotoxine. Les mortalités furent enregistrées après 24 Heures.

Tableau des résultats

Groupe	Exotoxine	serum normal	NaCl	Volume total	poissons injectés	poissons morts	% mortal.
1	0,05		0,45	0,5	5	5	100
2	0,05		0,70	0,75	5	5	100
3			0,5	0,5	6	0	0
4			0,75	0,75	5	0	0
5		0,5		0,5	6	0	0
6		0,75	0,75		5	0	0
7	0,05	0,45		0,5	6	3	50
8	0,05	0,70		0,70	5	0	0

2/ Interprétation

Les résultats montrent qu'une dose de 0,05 ml, mortelle à 100% quand injectée dans du soluté salé tamponné par voie intra-péritonéale, voit ses effets toxiques nettement atténués quand elle est injectée après incubation dans du serum de truite arc-en-ciel saine : la mortalité n'est que de 50 % quand l'exotoxine est diluée au 1/10 et elle est nulle quand l'exotoxine est diluée au 1/15. De plus, ni symptômes, ni lésions n'apparaissent sur les poissons ainsi protégés (sacrifiés après trois jours, l'étude histopathologique de leurs tissus ne révèle rien). On observe donc une inactivation complète de la toxicité de l'exotoxine.

C/ DEPRESSION DE CETTE ACTIVITE PROTECTRICE PAR DES INJECTIONS PREALABLES D'EXOTOXINE

1/ Expériences et résultats

- 5 poissons-tests du lot II reçurent par voie intra-péritonéale 0,4 ml d'exotoxine.

Serums	Titre àh5	Titre à h24	Titre àh60	Titre à h90
Tests 1	12	24	16	16
Tests 2	12	24	16	12
Tests 3	16	24	16	16
Tests 4	16	32	24	16
Tests 5	12	24	16	12
Témoin sain	12	12	8	12
Témoin sans sérum	256	256	192	256

- 9 poissons-tests
  5 poissons-témoins du Lot II reçurent par voie IP { 0,3ml d'exotoxine / 0,3 ml de NaCl

puis 6 jours plus tard { 0,45 ml de toxine / 0,45 ml de NaCl

Résultats à j6+24h

	témoin s. s.	Résultats à j6+24 h: 1	2	3	4	5	6	7	8	9	témoins 1	2	3	4	5
Titre	256	128	64	64	64	48	64	64	64	96	24	12	12	16	14

Un test U de Mann & Whitney appliqué à ces derniers résultats donne une différence dans les titres significative au seuil de 0,1%.

2/ Interprétation

Les résultats précédents mettent en évidence le fait que l'exotoxine a in vivo un rôle dépresseur du facteur sérique de défense aspécifique mis en évidence plus haut (le sérum de poisson ayant subi une injection préalable d'exotoxine possède des propriétés anti-hémolytiques nettement atténuées). Cette action se manifeste après un certain temps de latence (compris entre 5 et 24 heures), et se maintient en s'atténuant lentement pendant plusieurs jours. Des injections répétées d'exotoxine entretiennent cette action.

III - DISCUSSION

1/ L'exotoxine produite par la bactérie Aeromonas salmonicida et isolée par la technique de la feuille de cellophane, agissant grâce à (un ou) des facteurs protéolytique et lipolytique puissants, possède une forte cytotoxicité, s'exerçant plus particulièrement vis-à-vis de la fibre musculaire et des cellules sanguines.

Les effets de l'exotoxine in vitro sur diverses préparations cellulaires confirment qu'elle a des propriétés protéolytiques, hémolytiques et leucocytolytiques de même qu'inhibitrices du comportement normal de cellules telles que les macrophages (rétraction des pseudopodes et modification cellulaire).

L'hémolyse est retrouvée dans les expériences réalisées in vivo ; les résultats de Fuller, Pilcher et Fryer (1977) permettent de penser que la leucocytolyse également se produit après injection d'exotoxine. La nécrose du muscle et du tissu collagène dans les myosepta, l'épicarde, la rate et le stratum compactum du derme et du tube digestif, montre que muscle et collagène sont des substrats préférentiels pour l'exotoxine.

2/ A peu près tous les symptômes et lésions associés classiquement à la furonculose peuvent être reproduits par injection d'exotoxine seule, en l'absence de la bactérie. Une dose suffisante administrée par voie intra-péritonéale est rapidement fatale pour les poissons. En plus faible quantité elle est aussi fatale mais prolonge la vie de telle façon que des changements histopathologiques importants interviennent au niveau de

la rate, du rein, du coeur et de l'intestin. Cette histopathologie correspond en de très nombreux points à celle décrite pour la maladie aiguë (cf la première partie). Cependant une lésion associée à la furonculose aiguë n'est pas retrouvée ici : il s'agit de la nécrose liquéfactive du tissu hématopoïétique du rein, associée à une dépression de la réponse inflammatoire. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'expérimentation ne fut pas prolongée au-delà de 36 heures, tandis que Klontz et al (1966) rapportent que ces lésions ne furent pas observées avant 48 heures après inoculation de bactéries virulentes.

De même, la nécrose musculaire au point d'injection d'exotoxine par voie intra-musculaire et le "furoncle" oedémateux contenant du liquide sanguinolent, et la dissolution des myosepta s'étendant très loin du point d'injection font tout à fait penser à la description du "furoncle" classique des cas chroniques de furonculose du saumon atlantique (Mackie et Menzies, 1938).

3/ Cependant les serums de Salmonidés possèdent une substance capable de contrecarrer l'action protéolytique et hémolytique de l'exotoxine in vitro et tous les effets de cette exotoxine in vivo. Une globuline α-migrante de truite arc-en-ciel précipite avec la trypsine et au moins un composant de l'exotoxine, et n'est pas une protéine C-réactive. Ceci permet de dire que les poissons, comme les vertébrés supérieurs (Schultze et al, 1963) ont des globulines qui sont inhibitrices de protéases et de ce fait peuvent jouer un rôle important dans le contrôle des conditions physiopathologiques. La présence de cette αglobuline dans le serum d'animaux normaux et sains ex-

pliquerait le fait qu'il faut injecter des doses relativement élevées d'exotoxine pour reproduire les symptômes de la furonculose.

CONCLUSION

§ Schéma général de la pathogénie de la Furonculose, expliquée par la libération d'exotoxine par les bactéries.

L'étude précédente montre clairement que la plupart des facteurs de virulence de Aeromonas salmonicida, sinon tous, sont libérés dans le milieu par la bactérie. Toutes les souches de Aeromonas salmonicida produisent des facteurs semblables mais en quantités variables.

Deux traits de la Furonculose apparaissent de façon constante dans la littérature : les lésions de collagénolyse et de myocytolyse, et la suppression in fine de la réponse leucocytaire inflammatoire (par leucocytolyse). Toutes les autres lésions décrites peuvent être classées comme hémorragiques.

Ces données autorisent l'élaboration d'un schéma général possible de la pathogénie de la Furonculose : en fonction de la voie de pénétration de la bactérie, elle va coloniser différents tissus du poisson. Le rein et la rate sont généralement affectés car ce sont des filtres phagocytaires. Une fois installées dans ces organes, les bactéries libèrent localement l'exotoxine dont les effets (destruction localisée du collagène et inactivation des phagocytes) sont contrecarrés par la présence de l'αglobuline sérique ; et les lésions n'apparaissent que quand l'exotoxine épuise cette αglobuline localement ou généra-

lement : splénomégalie et nécrose liquéfactive du rein. D'autres organes peuvent être affectés par la localisation fortuite des bactéries.

La généralisation de l'infection suit le processus suivant : l'activité leucocytotoxique de l'exotoxine prévient la destruction effective des colonies bactériennes par des leucocytes ; quand l'α globuline est débordée localement, l'activité leucocytolytique des bactéries est renforcée et aboutit à une leucopénie qui permet la dispersion de bactéries qui vont coloniser d'autres organes via le système circulatoire.

Mais d'autres phénomènes s'ajoutent probablement à l'action de l'exotoxine, phénomènes déclenchés par sa présence : dans le muscle, la lyse intense peut être due, outre à la protéase exotoxinique, à la nécrose musculaire elle-même, qui libère des myoprotéases intracellulaires et lysosomales (catheptases) qui amplifieraient les effets lytiques. Chez les vertébrés supérieurs, la présence d'une α_2 macroglobuline est un important facteur d'inhibition de ces enzymes libérées par nécrose (Horne, Forbes et Prentice, 1973), mais ici un tel facteur se verrait localement inactivé par la protéase exotoxinique.

D'autre part, chez les poissons inoculés par voie intra-abdominale, les lésions intestinales observées sont d'un intérêt considérable : vasodilatation, infiltration leucocytaire et oedème se produisent à différents degrés dans la lamina propria. On y trouve en grande quantité des cellules granuleuses éosinophiles dont beaucoup ont libéré leurs granules éosinophiliques. Il est probable que

les éosinophiles sont analogues aux mastocytes (Ellis, 1977) et contiennent des substances pharmacologiquement actives telles que l'histamine (données non publiées) qui dispersées produisent une vasodilatation marquée et un oedème. On a observé une augmentation du nombre de ces éosinophiles dans le rein, l'épicarde et leur présence au niveau des branchies, ce qui indiquerait que les éosinophiles ne sont pas des cellules statiques et peuvent être mobilisés . Si l'exotoxine induit l'activation et la dégranulation des éosinophiles, libérant de l'histamine ou d'autres substances pharmacologiquement actives en grandes quantités, on conçoit que ces poissons meurent de choc aigü(défaillance circulatoire périphérique). Ceci expliquerait le fait que les poissons inoculés par voie intra-abdominale avec une dose létale d'exotoxine meurent en quelques heures mais n'extériorisent que de faibles signes pathologiques. Cette libération d'amines vaso-actives pourrait également expliquer les symptômes comportementaux observés dans la maladie aiguë, de léthargie et coma, engendrés par une diminution de la pression sanguine. Les lésions et la mort viendraient de la perte de l'intégrité du stroma et du système vasculaire due à l'action collagénolytique de l'exotoxine, avec hémorragie à la proximité des colonies bactériennes ; et peut-être par la suite, si l'α globuline sérique est épuisée, l'exotoxine entrainerait-elle une défaillance circulatoire généralisée.

La Furonculose chronique peut être due à la localisation de bactéries dans des organes tels que rate, foie, intestin, muscles, dont le dommage n'est pas immé-

diatement létal, bactéries qui sont temporairement maintenues là par des facteurs tels qu'un faible drainage lymphatique et la neutralisation de la toxine par l'αglobuline sérique. Dans la Furonculose suraiguë, l'exotoxine atteindrait d'emblée les organes essentiels comme coeur ou cerveau (par localisation des bactéries dans ces organes), amenant une mort rapide avec peu ou pas de signes pathologiques.

§§ Perspectives offertes par la connaissance de l'exotoxine dans la recherche d'un vaccin anti-Furonculose

Les problèmes à résoudre en matière de vaccination sont les suivants : le vaccin confère-t-il une protection ? Quelle voie convient-il d'utiliser? Quelle est la fraction immunogène?

La détermination du degré de protection par la mesure des anticorps neutralisants s'est révélée décevante: la quantité d'anticorps produite à la suite de la vaccination est seulement un signe qu'une certaine fraction antigénique a été absorbée et elle n'est pas forcément synonyme de protection.

La quasi-certitude que tous les facteurs de virulence de la bactérie Aeromonas salmonicida se retrouvent dans l'exotoxine pourrait être un élément décisif dans la recherche d'un vaccin préparé selon le principe de l'incorporation d'anatoxines. Mais il ne s'agit là que d'une première étape, et il faudra s'efforcer maintenant d'isoler et de caractériser les différents constituants de cette exotoxine et les mécanismes de défense mis en jeu par l'hôte.

: Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

Professeur DORCHIES

Vu : Le Directeur de l'Ecole
Vétérinaire

Professeur LAUTIE

: Le Président de la Thèse

Professeur ECALLE

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 30.09.81
L'Administrateur provisoire de
l'Université Paul Sabatier

Professeur D. BANCEL

ANNEXE

EVALUATION DU TAUX PROTEIQUE TOTAL DE L'EXOTOXINE

Souche MTOO 4

Evaluation par la méthode de Lowry et al (1951)

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ASB	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0	0	0	0	0
ED	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,54	0,57	0,585	0,5925	0,59625
EXT	0	0	0	0	0	0	0,06	0,03	0,015	$7,5.10^{-3}$	$3,75.10^{-3}$
FDEXT							10	20	40	80	160

ASB = Albumine sérique de bovin

ED = Eau distillée

EXT = Exotoxine

FDEXT = Facteur de dilution de l'exotoxine

A chaque tube on ajoute : 3 ml de réaction E (constitué de 100 ml de Na_2CO_3 dans NaOH 0,1M et de 2 ml de NaK tartrate 1 % contenant 0,5% de $CuSO_4$) + 0,3 ml de réactif F (constitué de 5 ml de Foline Ciocalteau et de 5 ml d'eau dist.)

Lecture au spectrophotomètre à 700 nm après 30 mn.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Abs	0	0,189	0,295	0,405	0,520	0,650	0,880	0,530	0,305	0,184	0,151

Les six premiers tubes servent à la construction de la courbe standard ; sur cette courbe, 0,305 correspond à 0,207 ml d'albumine de bovin (de concentration = 333 microgrammes/ml).

Concentration en protéines du tube 9 : (0,207/0,6) x333= 114,88 µg/ml

Concentration en protéines de l'exotoxine :

$114,88 \times 40 = 4,595 \times 10^3$ ug/ml, soit environ 4,6 mg/ml.

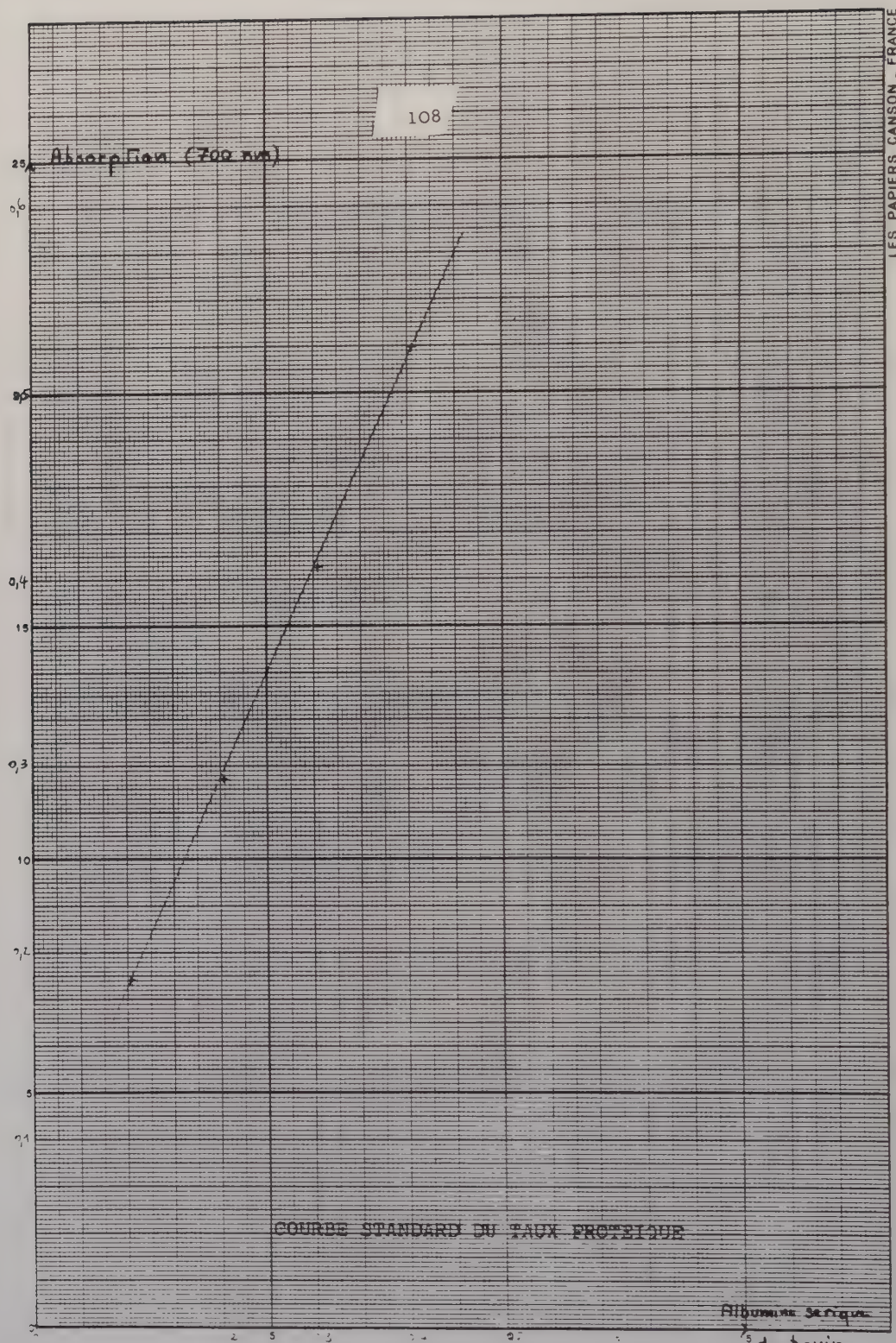
Autre calcul : 0,530 correspond à 0,410 ml d'albumine.

Concentration en protéines du tube 8 : (0,410/0,6)x0,333 = 0,2275 mg/ml.

Concentration en protéines de l'exotoxine : 0,2275 x 20 = 4,55 mg/ml.

On prendra comme valeur du taux protéique total de l'exotoxine

4,6 mg/ml.



COURBE STANDARD DU TAUX PROTEIQUE

LES PAPIERS CANSON - FRANCE

EQUIVALENCE ENTRE VOLUME D'EXOTOXINE ET NOMBRE DE BACTERIES

A/ COMPTAGE DES BACTERIES

1/ Matériel et méthode

- Cellule de comptage : la chambre est divisée en 16 carrés divisés chacun en 16 subdivisions (total : 256 subdivisions de surface 1/400mm2 chacune). Profondeur de la chambre : 0,02 mm

- Suspension bactérienne diluée à 10^7-10^8 cellules / ml (turbidité à peine visible)

On place deux gouttes de suspension à la surface de la chambre et une lamelle à double épaisseur fermement appliquée sur la lame.

- Nombre moyen de bactéries par subdivision = $\bar{x}$

Volume d'une subdivision: $0,02 \times 10^{-3} / 400 = 5.10^{-8}$ ml

Nombre moyen de bactéries par ml = $\bar{y} = \bar{x} / 5.10^{-8}$

On peut faire alors intervenir le facteur dilution.

2/ Résultats (souche MT004)

Facteur de dilution = 100

$\bar{x}$ = 25,5 (lecture de quatre subdivisions)

Nombre moyen de bactéries par ml de suspension diluée :

$\bar{y} = 25,5 / 5.10^{-8} = 5,1.10^8$

Nombre total moyen de bactéries / ml = $5,1.10^{10}$ bact./ml.

B/ EQUIVALENCE EN VOLUME D'EXOTOXINE (produite en 48 heures)

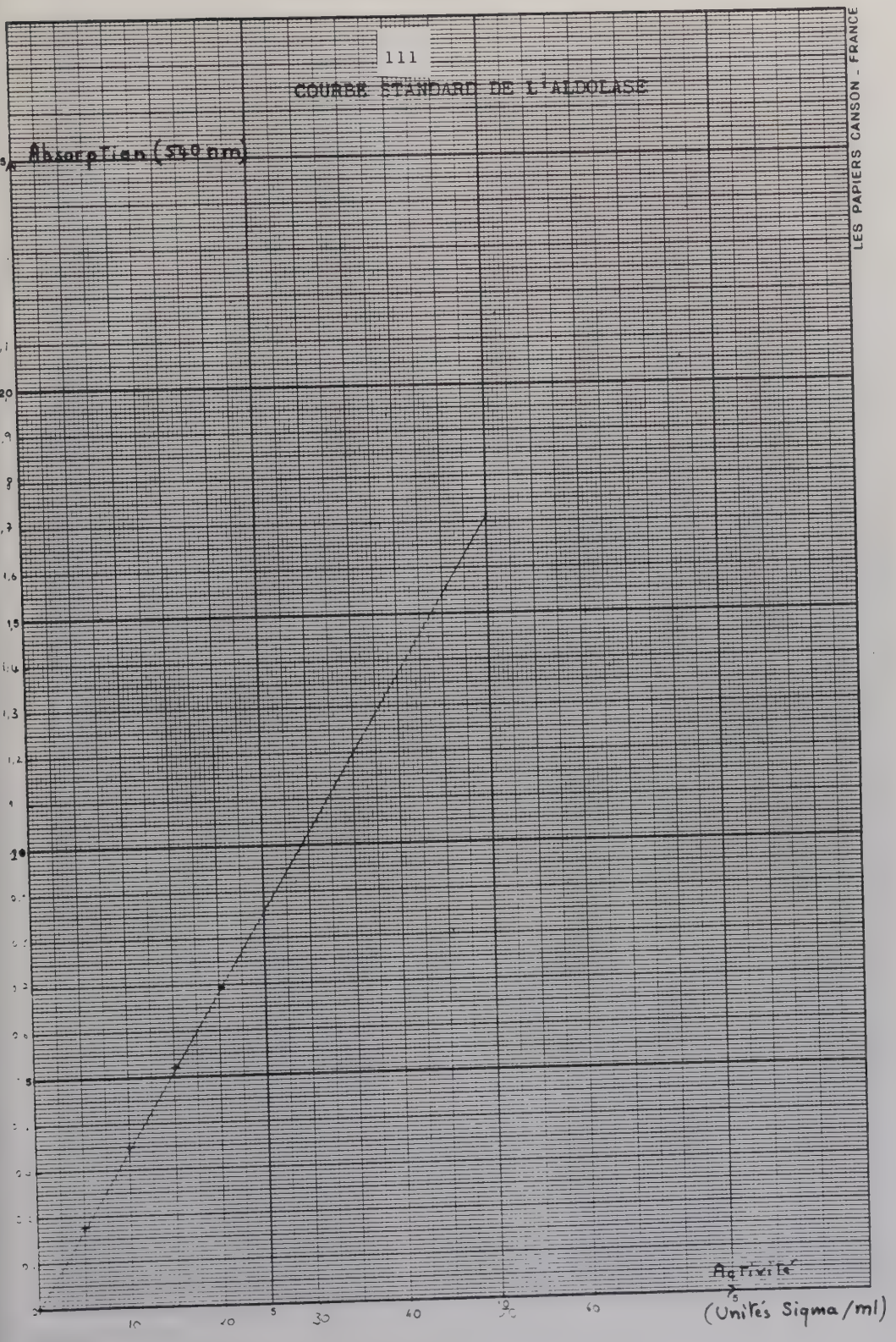
Au moment de la récolte, après centrifugation et séparation, à 1,2 ml de culot correspondent 10,5 ml d'exotoxine. On aurait donc : pour 1 ml de culot, 10,5/1,2 ml d'exotoxine

$5,1.10^{10}$ bactéries correspondent à 10,5/1,2 ml d'exotoxine.

Nombre moyen de bactéries correspondant à 1 ml d'exotoxine :

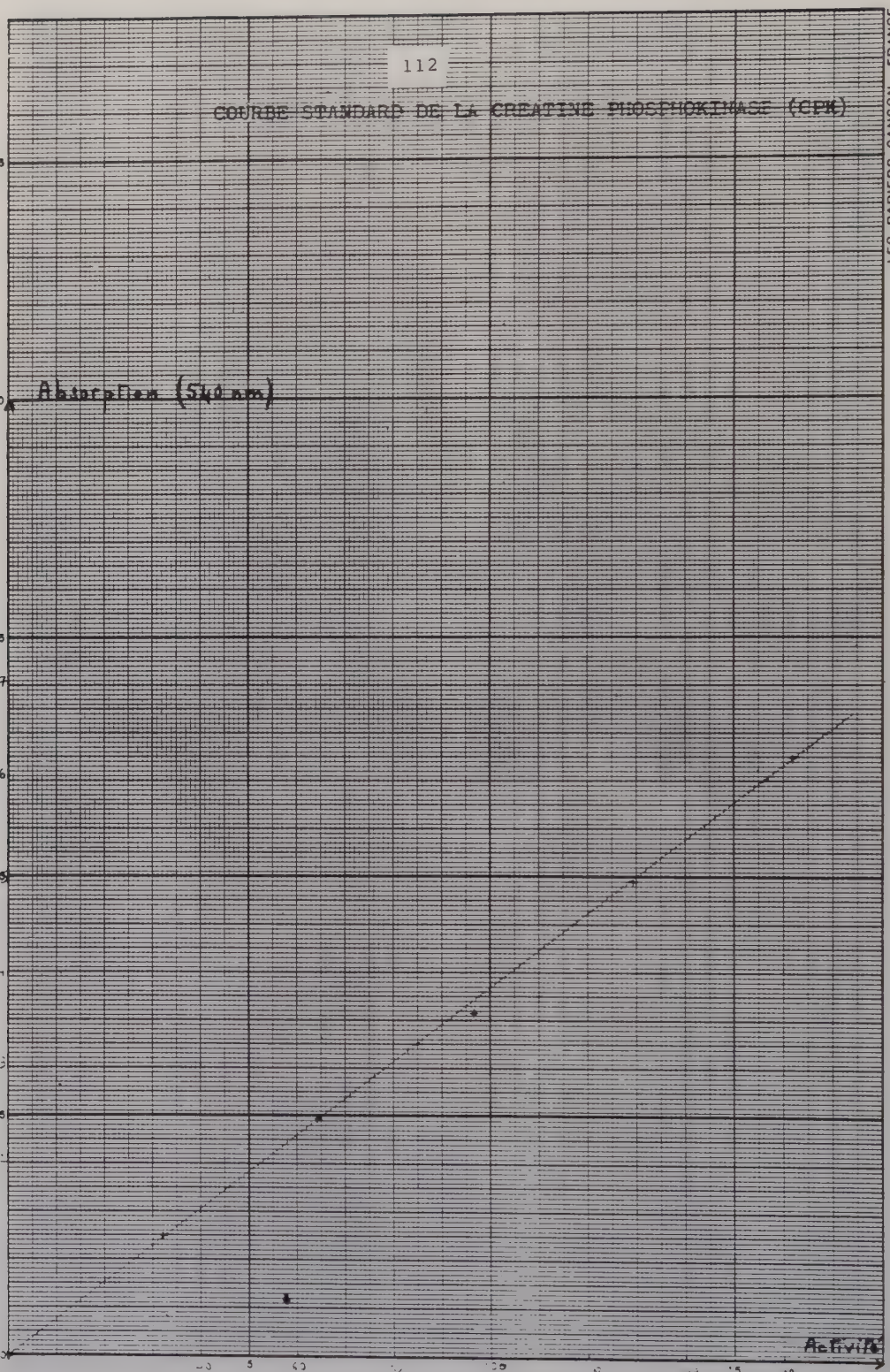
$5,1.10^{10}$ x 1,2/10,5 = $5,83.10^{9}$ bactéries /ml d'exotoxine.

COURBE STANDARD DE L'ALDOLASE



LES PAPIERS CANSON - FRANCE

COURBE STANDARD DE LA CREATINE PHOSPHOKINASE (CPK)



LES PAPIERS CANSON - FRANCE

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson D.P., 1972. Virulence and persistence of Rough and Smooth forms of Aeromonas salmonicida inoculated into Coho Salmon (Oncorhinchus kisutch). J. Fish. Res. Board of Canada, 29 (2), 204-206
- Anderson D.P., 1973. Investigations of the lipopolysaccharide fractions from Aeromonas salmonicida Smooth and Rough forms. In: Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control. F.A.O., Rome, pp.175-179.
- Antipa R. and Amend D.F., 1977. Immunization of pen-reared Pacific Salmon : comparison of intraperitoneal injection and hyper-osmotic infiltration of Vibrio anguillarum and Aeromonas salmonicida. J. Fish. Res. Board of Canada, 34, 203-208.
- Aoki T., Egusa S., Kimura T., Watanabe T., 1971. Detection of R factors in naturally occuring Aeromonas salmonicida strains. Applied Microbiology, 22, 716-717
- Aribert-Desjardins M., 1978. La prophylaxie des principales maladies transmissibles des poissons d'eau douce en pisciculture : méthodes, réglementation, avenir. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Bayle J.M., 1972. Contribution à l'étude de la Furonculose des Salmonidés ; sur une enzootie de Furonculose de la truite à Xanthomonas piscicola. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

- Bøyum A., 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21 : Suppl. 97:77
- Bullock G.L., Stuckey H.M., Dollis C., Herman C.L., Maestrone G., 1974. In vitro and in vivo efficacy of a potentiated sulphonamide in control of Furunculosis in Salmonids. J. Fish. Res. Board of Canada, 31, 75-82.
- Bullock A.M. and Roberts R.J., 1974. The dermatology of marine teleost fish. I :The normal integument. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 13, 383-411
- Bullock G.L. and Stuckey H.M., 1975. Detection of asymptomatically infected trout. Prog. Fish Cult., 37, 237-239.
- Collins V.G., 1970. Recent studies of bacterial pathogens of freshwater fish. Wat. Treat. Exam.,19, 3-31
- Cornick J.W., Chudyk R.V., McDermott L.A., 1969. Habitat and viability studies on Aeromonas salmonicida, causative agent of Furunculosis. Prog. Fish Cult.,31, 90-93
- Diagnostic Reagents Ltd. Measurement of Haemoglobin using the cyanmethaemoglobin method. Technical Bulletin n°217
- Dubois-Darnaudpeys A., 1976. Contribution à l'épidémiologie de la Furonculose des Salmonidés.Devenir de Aeromonas salmonicida dans le milieu dulçaquicole. Thèse de doctorat de IIIè cycle, Université P. et M. Curie, Paris
- Duff D.C.B., 1939. Some serological relationships of the S, R and G phases of Bacillus salmonicida. J. Bact., 38, 91-100
- Duff D.C.B., 1942. The oral immunization of trout against Bacterium salmonicida. J. Immunol., 44, 87-94.

- Ellis A.E., 1977. The leucocytes of fish : a review. Journal of Fish Biology, 11, 453-491
- Esselmann M.T., Pinghui V. & Liu, 1960. Lecithinase production of Gram-negative bacteria. J. Bacteriol., 81, 939-945
- Evelyn T.P.T., 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen Aeromonas salmonicida isolated from a marine host, the sable fish (Anoplopoma fimbria), and from two species of cultured Pacific Salmon. J. Fish. Res. Board of Canada, 28, 1629-1634.
- Ferguson H.W. & McCarthy D.H., 1978. Histopathology of Furunculosis in Brown Trout Salmo trutta L.J. Fish Dis., 1, 165 - 174.
- Fuller D.W., Pilcher K.S. & Fryer J.L., 1977. A Leucocytolytic factor isolated from cultures of Aeromonas salmonicida. J. Fish. Res. Board of Canada, 34, 1118-1125.
- Herman R.L., 1968. Fish Furunculosis. Transactions of the American Fisheries Society, 97, 221-230.
- Horne J.H., 1928. Furunculosis in trout and the importance of carriers in the spread of the disease. J. Hyg. Camb., 28, 67-78
- Karlsson K.A., 1962. Studies on the haemolysin of Aeromonas salmonicida. Nord Vet. Med., 14 Suppl.2
- Klontz G.W. & Anderson D.P., 1970. Oral immunization of Salmonids : a review. In : Symposium on diseases of fish and wildlife, ed. by S.F. Snieszko, Washington, D.C. American Fisheries Society Special Publication n°5, 16-20.
- Klontz G.W., Yasutake W.T., Ross J.A., 1966. Bacterial disease of the Salmonids in the Western United States: Pathogenesis of Furunculosis in Rainbow Trout. Amer. J. Vet. Res., 27, 1455-1460

- Krantz G.E., Reddecliff J.M., & Heist C.E., 1963. Development of antibodies against Aeromonas salmonicida in trout. J. Immunol., 91, 757-760.
- Krantz G.E., Reddecliff J.M., & Heist C.E., 1964a. Immune response of trout to Aeromonas salmonicida. Part I : Development of agglutinating antibodies and protective immunity. Prog. Fish.Cult., 26,3-10
- Krantz G.E., Reddecliff J.M., & Heist C.E., 1964b. Immune response of trout to Aeromonas salmonicida. Part II : Evaluation of feeding techniques. Prog. Fish Cult., 26, 65-69
- Liu P.V., 1957. Survey of haemolysin production among species of Pseudomonads. J. Bacteriol., 74, 718-727.
- Lowry O.H., Rosebrough N.H., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 197, 265-275.
- Mackie T.J., Arkwright J.A., Pryce-Tannat T.E., Mottram J.C., Johnson W.D., Menzies W.J.M., 1935. Final report of the Furunculosis Committee. H.M. Stationery Office, Edinbourg, 67pp.
- Mackie T.J., & Menzies W.J.M., 1938. Investigations in Great-Britain on Furunculosis of the Salmonidae. J. Comp. Pathol. Ther. 51 : 225.
- McCarthy D.H., 1975. Detection of Aeromonas salmonicida antigen in diseased fish tissue. J. Gen. Microbiol.,88, 384-386
- McCarthy D.H., 1977a. Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen, Aeromonas salmonicida. Aquatic Microbiology, SAB Symposium, 6, 299-324
- McCarthy D.H., 1977b. A latex test for rapid identification of both pure and mixed agar cultures of Aeromonas salmonicida. Fish Health News, 6, 146-147.

- McCarthy D.H. and Rawle C.T., 1975. The rapid serological diagnosis of fish Furunculosis caused by Smooth and Rough strains of Aeromonas salmonicida. J. Gen. Microbiol., 86, 185-187
- McCarthy D.H., Stevenson J.P., & Roberts M.J., 1974. Therapeutic efficacy of a potentiated sulphonamide in experimental Furunculosis. Aquaculture, 4, 407-410.
- McCarthy D.H. and Whitehead C., 1977. An immuno-india ink technique for rapid laboratory diagnosis of fish Furunculosis. J. Appl. Bact., 42, 429-431
- McCraw B.M., 1952. Furunculosis of fish. U.S. Fish Wildlife Service Spec. Sci. Pep. Fish, 84, 87 pp.
- McDonald C.E. & Chen L.L., 1965. The Lowry modification of the Folin reagent for determination of proteinase activity. Anal. Biochem., 10, 175-177.
- McFadden T.W., 1970. Furunculosis in non-Salmonids. J. Fish. Res. Board of Canada, 27 (12), 2365-2370
- Meyer M., 1978. Cours de Statistiques (Ecole Normale Supérieure)
- Microbiology & Parasitology Team, 1978. Furunculosis Project ; Interim Report.D.A.F.S. Marine Laboratory, Aberdeen.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Bacterial techniques for diary purpose. Technical Bulletin N°17
- Munro A.L.S., Hastings T.S., Ellis A.E., & Liversidge J. 1980. Studies on an ichtyotoxic material produced extracellularly by the Furunculosis bacterium, Aeromonas salmonicida. Proceedings of the third session of the EIFAC (FAO)/ OIE Cooperative Program of Research on Aquaculture: Fish Disease, Munich 1979 ; 9 pp.
- Munro A.L.S., McCarthy D.H., Needham T., & Finlay J., 1979. Furunculosis. D.A.F.S. Marine Laboratory Aberdeen
- Novotny A.J., 1978. Vibriosis and Furunculosis in marine cultured Salmon in Puget Sound, Washington. Marine Fish. Rev., 40, 52-55.

- Paterson W.D., 1972. The antibody response of juvenile coho Salmon (Oncorhynchus kisutch) to Aeromonas salmonicida, the causative agent of Furunculosis. Doctoral thesis, Corvallis, Oregon State University.
- Paterson W.D. and Fryer J.F., 1974a. Immune response of juvenile coho Salmon (Oncorhyncus kisutch) to Aeromonas salmonicida cells administered intraperitoneally in Freund's complete adjuvant.
  J. Fish. Res. Board of Canada, 31, 1751-1755.
- Paterson W.D. and Fryer J.F., 1974b. Effects of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile Salmon (Oncorhyncus kisutch) to Aeromonas salmonicida endotoxin. J.Fish. Res. Board of Canada, 31, 1743-1749
- Popoff M., 1969. Etude sur les Aeromonas salmonicida. I. Caractères biochimiques et antigéniques. Rech. Veter., 3, 49-57.
- Popoff M., 1971. Etude sur les Aeromonas salmonicida.II. Caracterisation des bactériophages actifs sur les Aeromonas salmonicida et lysotypie. Annal. Rech. Véter., 2(1), 33-45
- Rabb L., Cornick J.W., McDermott L.A., 1964. A macroscopic slide agglutination test for the presumptive diagnosis of Furunculosis in fish. Prog. Fish Cult., 26, 118-120
- Roberts R.J., 1977. Pathology of fish. Traduction française de P. d'Hauteville, ed. Malloine.
- Scott M., 1968. The pathogenicity of Aeromonas salmonicida in sea and brackish waters. J. Gen. Microbiol.,50, 321-327
- Shieh H.S. and McLean J.R., 1975. Purification and properties of an extracellular protease of Aeromonas salmonicida, the causative agent of Furunculosis. Int. J. Biochem., 6, 653-656.

- Shieh H.S., 1976. Changes of blood enzymes in brook trout induced by infection with Aeromonas salmonicida. J. Fish. Biol., 12, 13-18.
- Sigma Histopaque 1077. Technical Bulletin n°1077. For isolation of Lymphocytes.
- Sigma CPK. Technical Bulletin N°520. The colorimetric determination of Creatine Phosphokinase at 500-540 nm in serum.
- Sigma Aldolase. Technical Bulletin N°752. The colorimetric determination of Aldolase in serum (520-600nm).
- Smith P.D., 1980. Studies of vaccination of Atlantic Salmon against Furunculosis. In : Third session of EIFAC-COPRAQ Fish Disease Symposium, Munich 1979
- Snieszko S.F., 1974a. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. J. Fish. Res. Board of Canada, 6, 197-208.
- Snieszko S.F., 1974b. Furonculose des Salmonidés. EIFAC/T 17 (suppl.2)
- Styles J.A., 1974. Use of tissue culture in toxicological testing. In: Current approaches in toxicology, chapter E.
- Tuffery G., 1971. Ecopathologie des systèmes piscicoles. Colloque sur la biologie et l'aménagement des pêches. Biarritz.
- Udey L.R. and Fryer J.L., 1978. Immunization of fish with bacterins of Aeromonas salmonicida. Marine Fisheries Review, 40, n°3, 12-17.